

Mastergradsoppgave i kjemi

**Strukturbestemmelse av
to-peptidbakteriocinet
plantaracin EF
i membranliknende miljø ved
bruk av NMR-spektroskopi**

Av Nina Fimland

Omfang: 60 studiepoeng

KJEMISK INSTITUTT
Det matematisk-naturvitenskapelige
fakultet
UNIVERSITETET I OSLO 2007



Forord

Kjernemagnetisk-resonans (NMR)-spektroskopi er utført på Kjemisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Produksjon og rensing av peptider, tillaging av løsninger til CD- og NMR-spektroskopi, CD-målinger og NMR-strukturkalkuleringer har vært utført på Institutt for Molekylær Biovitenskap, Universitetet i Oslo.

Jeg er takknemlig for å ha hatt en interessant og lærerik studietid som har gitt meg inspirasjon i mitt arbeid som lærer i videregående skole.

Først vil jeg takke min veileder dr. Per Eugen Kristiansen fordi vi har hatt et godt og hyggelig samarbeid, fordi du har inspirert meg faglig gjennom kyndig veiledning og positive tilbakemeldinger, og ikke minst fordi du har vært fleksibel med hensyn på veiledningstidspunkter.

Jeg vil takke Gunnar som har produsert og rensert peptider til meg, og som har gjort dette prosjektet mulig. Du har støttet meg fullt ut i en travel periode og har tatt meransvar i familien.

Jeg vil også takke Per Rogne for hjelp i innspurten og prof. Jon Nissen-Meyer fordi du tok deg tid til gjennomlesning og til å gi meg tilbakemelding på oppgaven.

Til sist vil jeg takke Jostein, Tiril og Maren fordi dere er mine små lyspunkter i tilværelsen og fordi dere har vært tålmodige med mamma.

Oslo, mai 2007

Nina Fimland

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Sammendrag	1
2	Innledning	1
2.1	Antimikrobielle peptider	2
2.2	Bakteriociner	3
2.3	Klassifisering av bakteriociner produsert av melkesyrebakterier	4
	Klasse IIa	5
	Klasse IIc	6
	Klasse IIb: To-peptid-bakteriociner	6
3	Beskrivelse av metodene som er brukt i dette studiet	8
3.1	Circular Dichroism (CD)- spektroskopi	8
3.2	NMR-spektroskopi	11
3.2.1	Generell teori	11
3.2.2	Generelt om 2D- og 3D-eksperimenter	14
3.2.3	NOESY	15
3.2.4	TOCSY	16
3.2.5	HSQC	17
3.2.6	Bruk av NMR på peptider og proteiner	18
3.2.7	NMR-prøve	19
3.2.8	Resonansassignering av proteiner ved NMR-spektroskopi	21
3.2.9	Skift-verdier	22
3.2.10	NOE-effekter i proteiner	25
3.2.11	Strukturkalkulering fra NMR-data ved hjelp av CANDID og CYANA	26
4	Materialer og metoder	28
4.1	Tillaging av ^{15}N -isotop-merket plnE og plnF.	28
4.2	CD-målinger	28
4.3	Tillaging av NMR-prøver	29
4.4	NMR-spektroskopi	29

4.5	Strukturkalkulering	30
4.6	Utstyr og kjemikalier	31
5	Resultater og diskusjon	32
5.1	Analyse av plantaracin E og plantaracin F ved Circular Dichroism (CD)-spektroskopi	32
5.2	Helikshjul-representasjoner	40
5.3	Resonansassignering av plnF og plnE.	41
5.4	Kjemisk skift indeksing (CSI)	50
5.5	Resultater av strukturkalkuleringen	51
5.5.1	Strukturkalkulering av plnF	51
5.5.2	Strukturkalkuleringen av plnE.	57
5.5.3	Resultater og betraktninger om plnF	61
5.5.4	Resultater og betraktninger om plnE	64
5.5.5	Oppsummering og diskusjon	67
6	Referanser	69
	VEDLEGG:	76
Vedlegg 1	Forkortelser som er brukt i oppgaven	76
Vedlegg 2	Protonskiftlister for plnE og plnF	77
	Protonskiftliste for plnE	77
	Protonskift-liste for plnF	78
Vedlegg 3	Avstandsbegrensninger for plnE og plnF	79
	Avstandsbegrensninger, plnE	79
	Avstandsbegrensninger, plnF	90

1 Sammenheng

Antimikrobielle peptider produsert av melkesyrebakterier er en gruppe forbindelser som er av interesse innenfor næringsmiddelindustri og medisin. To-peptidbakteriociner er en gruppe peptider som hører inn under disse.

Plantaracin E og plantaracin F består av henholdsvis 33 og 34 residuer og utgjør tilsammen to-peptidbakteriocinet plantaracinEF.

Circular Dichroism-studier av plantaracin E og plantaracin F har vist at disse peptidene er ustrukturerte i vann, og at de struktureres i membran-liknende miljø som i dodecylphosphocholin-miceller.

Kjernemagnetisk resonans (NMR)-spektroskopi har vært brukt i strukturbestemmelse av peptidene i vandig løsning tilsatt dodecylphosphocholin-miceller. Peptidene er blitt undersøkt hver for seg.

Det er vist at plantaracin E består av to amfifile heliksområder (residue 10-21 og residue 25-30) som er avbrutt av et mer fleksibelt område (residue 22-24). Den N-terminale enden (residue 1-9) og den C-terminale enden (residue 31-33) er ustrukturerte.

Plantaracin F består av et amfifilt heliksområde (residue 6-30) som ser ut til å være avbrutt av en knekk ved prolin20. Den N-terminale enden (residue 1-5) og den C-terminale enden (31-34) er ustrukturerte.

2 Innledning

Målet med dette studiet har vært å bestemme strukturen til de to antimikrobielle peptidene plantaricin E og plantaricin F i membranliknende miljø ved hjelp av NMR (kjernemagnetisk resonans)-spektroskopi. Disse to peptidene utgjør tilsammen to-peptid-bakteriocinet plantaracin EF.

Kjennskap til disse peptidenes struktur kan bidra til økt forståelse av deres virkningsmekanisme.

2.1 Antimikrobielle peptider

Alle levende organismer er eksponert for konkurrerende og/eller patogene mikroorganismer og har utviklet ulike mekanismer for å forsvare seg mot disse. For mennesker og andre høyerestående dyr er et godt immunsystem avgjørende for å kunne motstå kontinuerlige angrep fra ulike mikroorganismer.

I enkelte tilfeller der immunsystemet ikke strekker til vil behandling med antibiotika være nødvendig. Dessverre har det store forbruket av antibiotika ført til økt forekomst av bakterier som har utviklet multi-antibiotikaresistens (med multi-antibiotikaresistens menes at en bakterie viser motstandsdyktighet mot flere typer antibiotika). Denne problemstillingen har gjort at man har fått spesiell interesse for en gruppe relativt nyoppdagete forbindelser som går under betegnelsen antimikrobielle peptider. Det har vist seg at disse forbindelsene utgjør en viktig del av immunsystemet for alle typer høyerestående organismer, som f.eks. amfibier og mennesker. Antimikrobielle peptider består av ca. 20-50 aminosyreresiduer, de er ofte kationiske og har ofte en amfifil karakter.

Antimikrobielle peptider dreper oftest målorganismer ved å danne ”porer” i cellemembranen; såkalt membranpermeabilisering (Hancock 2001; Epand and Vogel, 1999). Prokaryote cellemembraner inneholder som oftest negativt ladde fosfolipider som gir cellemembranen en negativt ladet overflate. Den negative ladningen ser ut til å være viktig for binding av positivt ladde antimikrobielle peptider via elektrostatiske interaksjoner. Ut fra denne modellen kan man også forklare hvorfor antimikrobielle peptider ikke dreper eukaryote celler, -fordi

disse har nøytral/zwitterionsk cellemembran og dermed mindre mulighet for å danne elektrostatiske interaksjoner til de kationiske peptidene.

Man har funnet at antimikrobielle peptider blir produsert i de aller fleste organismer fra bakterier til høyerestående organismer som f.eks. mennesker. Mer enn 500 antimikrobielle peptider er nå karakterisert (Nissen-Meyer and Nes, 1997; Hancock, 2001). Hos bakterier antas antimikrobielle peptider å gi et konkurransemessig fortrinn i kampen om næring.

2.2 Bakteriociner

Antimikrobielle peptider som blir produsert av bakterier blir ofte kalt bakteriociner, men bakteriociner har en videre definisjon som også inkluderer antimikrobielle proteiner med enzymatisk aktivitet (eks. enkelte coliciner (Kolade *et al.* 2002)). En relativt ny definisjon av bakteriociner er at de er ribosomalt produserte antimikrobielle forbindelser (peptider og proteiner) (Nes *et al.* 2002). Det at bakteriociner lages ribosomalt skiller dem fra annen naturlig antibiotika fordi disse blir syntetisert ved hjelp av unike enzymatiske systemer. Bakteriociner har i tillegg ofte en smalere målspesifisitet enn typiske antibiotika brukt innen medisin. For å beskytte seg selv lager bakteriocin-produsenten et immunitetsprotein. Det respektive immunitetsgenet er som oftest lokalisert på samme operon som selve bakteriocin-genet. Til sammenlikning er typiske antibiotikaresistans-gener ikke knyttet til genene for biosyntese av antibiotika. I tillegg blir bakteriociner oftest produsert i bakteriers vekstfase i motsetning til annen antibiotika som er sekundære metabolitter produsert i stasjonær fase.

De fleste bakteriociner dreper målceller ved membranpermeabilisering, men også andre virkningsmekanismer (DNase-/RNase-aktivitet) er rapportert (Kolade *et al.* 2002). Generelt viser bakteriociner sterkest antimikrobiell aktivitet overfor bakterier som er nært beslektet med bakteriocin-produsenten (Nes *et al.* 2002)

Man har viet spesielt stor oppmerksomhet til bakteriociner som er produsert av melkesyrebakterier. Dette er fordi melkesyrebakterier er godt dokumentert som ufarlige for mennesker og dyr, og at de har en naturlig forekomst i mat og dyrefôr. Melkesyrebakterier er mye brukt i næringsmiddel-industrien til bl.a. produksjon av fermenterte melkeprodukter. Mange ser for seg et stort økonomisk potensial i å kombinere melkesyrebakterienes evne til å fermentere mat med

deres evne til å produsere bakteriociner som vil kunne bidra til å øke matens holdbarhet uten tilsetning av kunstige konserveringsmidler. Et langsiktig mål for næringsmiddelindustrien er å redusere bruken av syntetiske konserveringsmidler.

2.3 Klassifisering av bakteriociner produsert av melkesyrebakterier

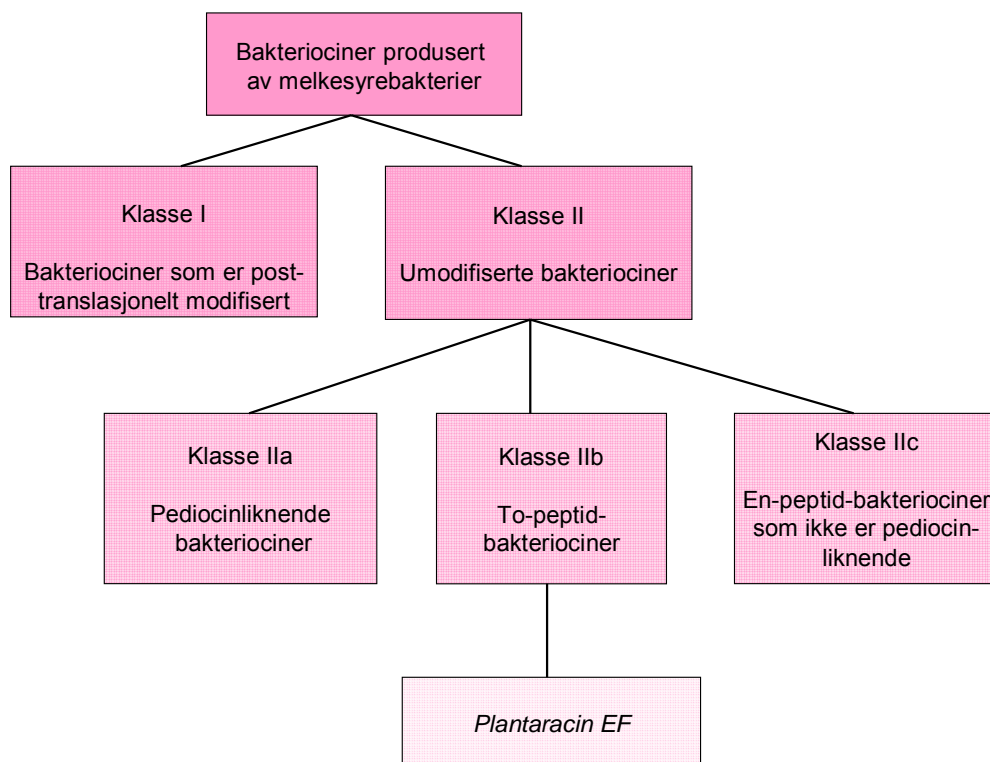
Man kan klassifisere bakteriociner utfra virkningsmekanismer, kjemiske- og fysiske egenskaper og hvordan de blir syntetisert. I denne oppgaven blir det fokusert på klassifisering av bakteriociner produsert av melkesyrebakterier. (Et oversiktskart er gitt i figur 2.3.1).

Melkesyrebakterieproduserte bakteriociner deles inn i to hovedgrupper basert på biosyntese:

Klasse I: Bakteriociner som er post-translasjonelt modifisert, såkalte lantibiotika.

Klasse II: Bakteriociner som er umodifisert.

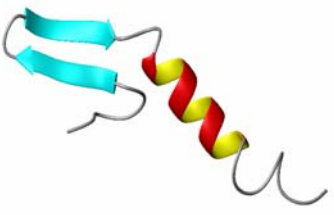
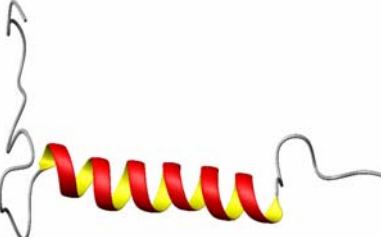
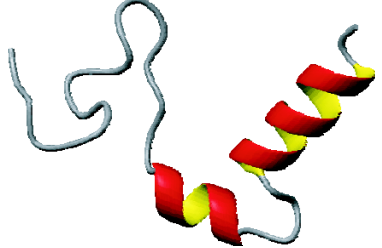
Neste nivå av klassifisering gjøres på grunnlag av bakteriocinenes virkningsmekanisme. Man skiller mellom en-peptid- og to-peptidbakteriociner. Videre klassifisering gjøres på grunnlag av likhet i aminosyre-sekvens. Nylig er flere lactococcin G-liknende to-peptid-bakteriociner oppdaget og man kan godt foreslå at disse sammen utgjør en egen undergruppe av umodifiserte bakteriociner (Oppegård *et al.* 2007). Det finnes også en klasse IIc som er alle umodifiserte en-peptid bakteriociner som ikke er pediocin-liknende.



Figur 2.3.1 Oversiktskart som viser klassifisering av bakteriociner produsert av melkesyrebakterier, og plasseringen av plantaricin EF i denne klassifiseringen.

Klasse IIa består av bakteriociner som har liknende primærstruktur med pediocin PA-1 som var det første bakteriocinet fra denne klassen som ble karakterisert (Nieto-Lozano *et al.* 1992). Disse blir derfor ofte kalt pediocinliknende bakteriociner og i dag er mer enn 21 ulike klasse IIa-bakteriociner kjent. De karakteriseres ved å ha et konserverv YGNGV-motiv, en disulfidbru i N-terminal ende og viser anti-listeria aktivitet. Utfra aminosyresekvens og lengde er de pediocin-liknende bakteriocinene videre foreslått inndelt i 3-4 sub-klasser (Fimland *et al.* 2002). Pediocin-liknende bakteriociner er godt karakterisert med hensyn til 3D-struktur (Figur 2.3.2). Peptidene består generelt av et N-terminalt β -plate struktur-liknende domene koplet via en fleksibel hengsels region til C-terminal alfa-heliks-basert hårnålsstruktur (Fimland *et al.* 2006). Ved å lage bakteriocin-hybrider hvor man kombinerer ulike C- og N-terminale domener fra ulike pediocin-liknende bakteriociner er det vist at C-terminalt domene er viktig for disse bakteriocinenes målcelle-spesifisitet og for gjenkjenning av respektive immunitetsproteiner (Johnsen *et al.* 2005).

Figur 2.3.2

		
Leucocin A	Carnobacteriocin B2	Curvacin A
Fregau-Gallagher <i>et al.</i> 1997	Wang <i>et al.</i> 1999	Haugen <i>et al.</i> 2005.

Klasse IIc består av umodifiserte en-peptid-bakteriociner som ikke er pediocin-liknende (mangler YGNGV-motiv). Det oppdages stadig nye, og eksempler på klasse IIc bakteriociner er lactococcin A og B. Enkelte bakteriociner som er plassert i denne gruppen har liknende primærstrukturer (carnobacteriocin A og enterocin B, Cintas *et al.* 1997).

Til forskjell fra klasse IIa- og klasse IIc-bakteriociner er klasse IIb såkalte to-peptid-bakteriociner. I den videre oppgaveteksten vil det bli fokusert på to-peptid-bakteriociner generelt og plantaracin EF spesielt.

Klasse IIb: To-peptid-bakteriociner

To-peptid-bakteriociner består av to ulike peptider som må virke sammen for å oppnå maksimal aktivitet. Det er vist at genene som koder for de to peptidene sitter etter hverandre på samme transkripsjons-enhet (Nes *et al.* 2002). I tillegg inneholder transkripsjonsenheten også et immunitetsgen. Denne typen bakteriociner har maksimal antimikrobiell effekt når de opptrer samtidig og liten eller ingen effekt når peptidene er hver for seg. Minst 10 slike bakteriociner er nå kjent (Nes *et al.* 2002).

Man finner ikke sekvenslikhet mellom de to peptidene i paret, men de enkelte peptidene har strukturrelasjoner både til én-peptid-bakteriociner og enkelt-peptider fra andre to-peptid-bakteriociner. Det første to-peptidbakteriocinet som ble karakterisert var Lactococcin G. Dette består av to peptider med henholdvis 35 og 39 aminosyreresiduer –disse peptidene er ustrukturert og interagerer ikke med hverandre i vann men danner amfifile α -helikser ved tilstedeværelse av membranliknende miljøer som for eksempel dodecylphosphocholin-miceller (Hauge *et al.* 1998). Man har vist at begge peptidene blir strukturert i slike membranliknende omgivelser når de blir tilsatt hver for seg, men man får større helikstruktur på begge når de blir tilsatt i et slikt miljø samtidig. Studier har også vist at man ikke får effekten med at de strukturerer hverandre, hvis det ene peptidet har bundet seg til micellene før tilsetning av det andre peptidet (Hauge *et al.* 1998b).

CD-strukturstudier av de to to-peptidbakteriocinene plantaricin JK og plantaricin EF har vist at disse består av amfifile α -helikser som blir strukturert i membranliknende omgivelser, og at disse blir ytterligere strukturert når peptidene i to-peptidet blir tilsatt samtidig (Hauge *et al.* 1999).

Plantaricin EF og plantaricin JK gjør membraner permeable for anioner og for monovalente kationer som f.eks. H^+ , men ikke for divalente kationer (eks. Mg^{2+}). Plantaricin EF leder kationer mer effektivt gjennom membranen enn plantaricin JK, og det motsatte gjelder med hensyn på anioner (Moll *et al.* 1999).

Plantaricin EF består av to kationiske peptider plnE og plnF som består av henholdsvis 34 og 33 aminosyreresiduer med molekylmasse på 3545 og 3703 g/mol. Aminosyresekvensene til plnE og plnF er gitt i tabell 2.3.1. Plantaricin EF og plantaricin JK blir produsert av *Lactobacillus plantarum* C11, og produksjonen av disse blir stimulert av peptid-feromonet plantaricin A (Dzung *et al.* 1996). Den antimikrobielle aktiviteten til PlnF øker med en faktor på mer enn 1000 når PlnE blir tilsatt i ekvimolare forhold og motsatt (Moll *et al.* 1999).

Tabell 2.3.1 Aminosyresekvenser for plnE og plnF.

plnE	FNRGGYNFGKSVRHVVDAIGSVAGIRGILKSIR
plnF	VFHAYSARGVRNNYKSAVGPDWVISAVRGFIHG

3 Beskrivelse av metodene som er brukt i dette studiet

3.1 Circular Dichroism (CD)- spektroskopi

Cirkular dichroism (CD) er en spektroskopisk metode der man bruker sirkulært planpolarisert lys.

CD-spekteret til en biopolymer gir oss informasjon om den sekundære strukturen til biopolymeren. CD er mer følsom og mindre tidkrevende enn NMR og brukes blant annet for å raskt undersøke den termiske stabiliteten til en biopolymer uten at man risikerer å ødelegge store mengder stoff.

Elektromagnetisk stråling har en magnetisk- og en elektrisk feltkomponent som står vinkelrett på hverandre. I vanlig lys svinger den elektriske feltstyrken på usystematisk måte i alle retninger normalt på lysets fartsretning. Ved å la lys passere et polarisasjonsfilter vil man selektere ut lys med en bestemt retning på den elektriske feltkomponenten, men med varierende størrelser –dette kalles lineært polarisert lys (Sheehan 2002).

Det har vist seg at hvis man sender planpolarisert lys gjennom løsninger av de ulike enantiomere utgavene av et kiralt molekyl, så vil lyset bli dreiet i ulik retning (Sheehan 2002)

Planpolarisert lys kan igjen ses på som summen av to vektorer med lik størrelse, men med ulik retning. Disse kalles henholdsvis venstre- og høyresirkulære polarisasjonskomponenter av det planpolariserte lyset. Man kan selektere ut disse ulike komponentene ved å la planpolarisert lys passere en fotoelastisk modulator (Sheehan 2002).

Når man lar sirkulært polarisert lys passere en løsning med optisk aktive molekyler, så vil lyset absorberes i henhold til Beer-Lamberts lov.

$$A = \epsilon cl$$

Formel 3.1.1

Der ϵ er den molare ekstinksjonskoeffisienten ($\text{Lcm}^{-1}\text{mol}^{-1}$), c (molL^{-1}) er konsentrasjonen av den aktive komponenten (kromoforen) og l er veilengden (cm).

For en løsning av optisk aktive molekyler vil den molare ekstinksjonskoeffisienten ha bestemte verdier for venstre- (ϵ_L) og høyresirkulært (ϵ_R) polarisert lys. Dette blir kalt circular dichroism (CD) (Sheehan 2002).

$$\epsilon_L - \epsilon_R = \Delta\epsilon \neq 0$$

Formel 3.1.2

Dette medfører en forskjell i absorbansen av venstre- og høyresirkulært planpolarisert lys:

$$\Delta A = \Delta\epsilon c l$$

Formel 3.1.3

Ved å lage en graf som viser ΔA eller $\Delta\epsilon$ som funksjon av bølgelengde λ , så får man et CD-spekter (Sheehan 2002).

I et CD-spektropolarimeter blir forskjellen i absorbans av venstre- og høyresirkulært polarisert lys registrert i en photomultiplier og konverteres til elliptisitet, θ (mD). Begrepet elliptisitet har sitt utspring i at sirkulært polarisert lys blir elliptisk polarisert etter å ha passert en optisk aktiv prøve (Sheehan 2002).

Elliptisiteten kan omgjøres til absorbans ved å bruke likningen nedenfor (Sheehan 2002).

$$\Delta A = \frac{\theta}{32982}$$

Formel 3.1.4

Proteiner gir karakteristiske CD-spektre som har sammenheng med den sekundære strukturen.

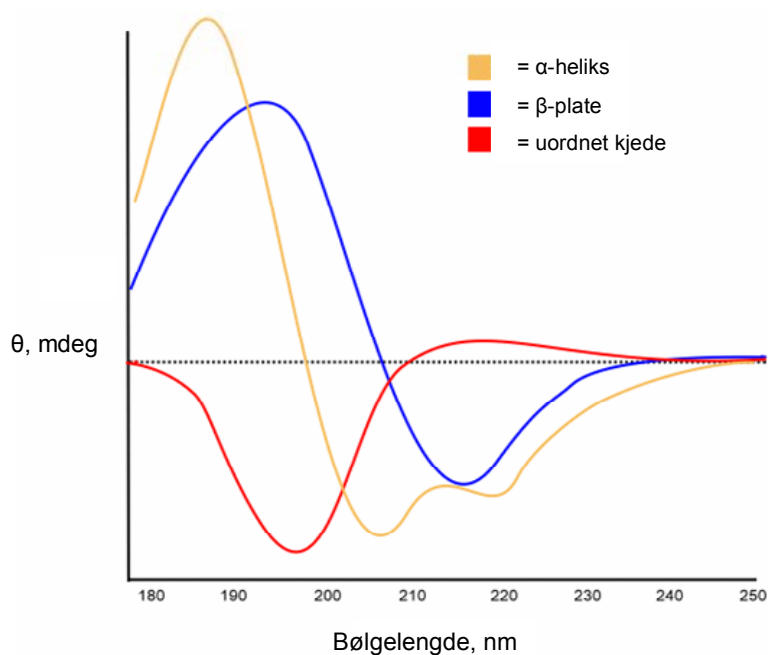
En α -heliks vil typisk ha negative bånd ved 222 nm og 208 nm, og et positivt bånd ved 190 nm (Holde et al. 2006). Størrelsen til båndet ved 222 nm kan brukes til å måle andel α -heliks i et protein da denne størrelsen er tilnærmet proporsjonal med $\Delta\epsilon$. I *enkeltpunkt-metoden* beregnes α -heliksinnholdet f_H ved å bruke likningen nedenfor der $[\theta]_{222}$ er gjennomsnittlig residue-elliptisitet ved 222 nm og n er antall peptidbånd (Scholtz *et al.* 1991).

$$f_H = [\theta]_{222}/(-40\,000(1-2,5/n))$$

Formel 3.1.5

β -strukturer vil gi et negativt bånd ved 215 nm og et positivt bånd ved 198 nm, men størrelsen på disse vil variere for mye til at de kan brukes til å beregne andel β -struktur utfra enkeltpunkter (Holde *et al.* 2006).

Figuren nedenfor viser karakteristiske CD-spektre til ulike sekundærstrukturer i proteiner.



Figur 3.1.1 Grafene viser typiske CD-spekter til proteinstrukturer for α -heliks, β -plate og uordnete kjeder. Figuren er funnet på proteinchemist.com, Dr. Ramy S. Farid.

Den sekundære strukturen kan også kvantifiseres ved å bruke full spektrum-metoder som er basert på bruk av referansesett der den sekundære strukturen er kjent fra røntgenkrystallografi (Sreerama *et al.* 2000; 2004). Referansesettene er sammensatt av strukturer med mange ulike sekundærstrukturkombinasjoner og variasjoner i CD-spekterne.

Dataprogrammene CDSSTR, SELCON3 og CONTIN i CDpro-pakken (Sreerama *et al.* 2000) beregner andel sekundærstruktur ved hjelp av ulike algoritmer.

CDSSTR er en metode som tar i bruk alle mulige kombinasjoner av et bestemt antall CD-spekter fra et referansesett, og benytter en algoritme basert på enkeltverdier (Forsythe *et al.* 1977).

Resultatet blir et gjennomsnitt av alle løsninger som tilfredstiller bestemte seleksjonsregler (Johnson, 1999).

I SELCON3 benyttes en selv-overenstemmende metode hvor man starter med å finne et CD-spekter blant referanseproteinene som er mest likt det ukjente proteinet (Sreerama *et al.* 1993).

CONTIN benytter en regresjonsprosedyre der man kalkulerer et CD-spekter som er tilpasset de observerte dataene ved å lage en lineær kombinasjon av CD-spekterne til N antall referanseproteiner. Et gjennomsnittresultat blir beregnet ut i fra de beste løsningene (Provencher *et al.* 1981). Det er vist at CONTIN er best ved beregning av α -heliksinhold (Sreerama *et al.* 2000).

3.2 NMR-spektroskopi

3.2.1 Generell teori

NMR, kjernemagnetisk resonans, har siden den første oppdagelsen av fenomenet i 1946 utviklet seg til å bli en velbrukt teknikk innenfor flere fagområder som f.eks. medisin, fysikk og kjemi, og NMR har spesielt stor anvendelse som verktøy for strukturbestemmelse av molekyler (Claridge 1999).

NMR baserer seg på at enkelte atomkjerner har en egenskap som kalles spinn. Alle atomkjerner er karakterisert ved et spinnkvantetall I , og det magnetiske momentet er begrenset av kvanteregler slik at kjernene kun har $2I + 1$ mulige spinntilstander (Claridge 1999). Normalt vil disse spinntilstandene ha samme energi, men ved å pålegge et magnetisk felt (B_0) vil de få en liten forskjell gitt ved ΔE (Claridge 1999),

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{Formel 3.2.1.1}$$

der h er Plancks konstant, γ (gyromagnetisk ratie) er en konstant som er bestemt av ”magnetstyrken” til den enkelte nuklide og B_0 er styrken på det pålagte feltet.

Følsomheten til NMR er bestemt av signal (S) til støy (N)-forhold som både avhenger av størrelsen på B_0 og γ (Claridge 1999).

$$\frac{S}{N} \propto B_0^{\frac{3}{2}} \cdot \gamma^{\frac{5}{2}} \quad \text{Formel 3.2.1.2}$$

Ulike isotoper har ulikt spinnkvantetall hvilket er avgjørende for hvorvidt de kan observeres ved hjelp av NMR. Isotoper som f.eks. ^1H , ^{15}N , ^{13}C , ^{19}F og ^{31}P er NMR-aktive, mens ^{12}C og ^{16}O har spinnkvantetall 0 og er ikke NMR-aktive (Claridge 1999).

Av de nevnte isotopene har ^1H den største γ -verdien og er derfor mest studert i NMR (Friebolin 1990) (se tabell 3.2.1.1).

Tabell 3.2.1.1 Gyromagnetisk ratie til et utvalg NMR-aktive isotoper (Friebolin 1990).

	^1H	^{13}C	^{15}N	^{31}P	^{19}F
$\gamma \text{ (} \cdot 10^{-7} \text{ radT}^{-1} \text{s}^{-1} \text{)}$	26,75	6,728	-2,713	10,83	25,18

I strukturbestemmelsen i dette studiet har en tatt utgangspunkt i ^1H - og ^{15}N -kjernene som har spinnkvantetall $\frac{1}{2}$ og som dermed har to mulige spinntilstander. Disse kjernene vil spinne med en presesjonsbevegelse som har en frekvens som er proporsjonal med størrelsen til det pålagte feltet (Larmorfrekvensen) (Claridge 1999). Kjernene som retter seg med feltet har noe lavere energi enn de som retter seg motsatt vei, og i henhold til Boltzmannfordelingen vil det være noen flere kjerner i den laveste energitilstanden (Claridge 1999).

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = e^{-\Delta E / kT} \quad \text{Formel 3.2.1.3}$$

N_{α} og N_{β} er antall kjerner i henholdsvis lav og høy energitilstand, k er Boltzmanns konstant og T er temperaturen.

Dette gir en netto magnetiseringsvektor (m_z) fra kjernene, i retningen til det pålagte magnetfeltet definert som z-aksen, mens vektorkomponentene i xy-planet vil utligne hverandre.

Elektromagnetisk stråling har en elektrisk- og en magnetisk feltkomponent, og ved å utsette en prøve som befinner seg i et magnetfelt for en kort magnetisk puls med en frekvens som er lik

kjernenes Larmorfrekvens (radiofrekvensområdet) så vil dette føre til at kjernene presser seg langs det nye magnetfeltet B_1 . Denne endringen av spinntilstandene kalles resonans (Claridge 1999).

Avhengig av størrelsen og varigheten på pulsen vil spinnene få endret orientering og gi opphav til netto magnetiseringsvektor i xy-planet (Claridge 1999).

Det magnetiske feltet fra M_{xy} -vektoren som roterer i xy-planet vil indusere en strøm i en elektrisk spole. Dette gir oss det karakteristiske signalet Free Induction Decay (FID), som viser den varierende strømmen som oppstår på grunn feltendringene (Claridge 1999).

Ulike relaksasjonsmekanismer gjør at M_{xy} -vektoren forsvinner ved at spinnene relakserer tilbake til likevekt i henhold til Boltzmannfordelingen, og signalet vil avta (Claridge 1999). Det skilles mellom to typer relaksasjon. Den ene er longitudinell relaksasjon, som betyr at spinnpopulasjonene kommer til likevekt ved at energi blir overført til omgivelsene i form av varme. Denne relaksasjonen er karakterisert av tidskonstanten T_1 . Den andre typen relaksasjon kalles transvers relaksasjon (T_2), og denne skyldes tap av netto magnetisering normalt på feltet. Dette tapet skyldes at kjerner interagerer og mister koherens. I tillegg vil små feltinhomogeniteter (fra prøven eller instrumentet) kunne føre til reduksjoner i magnetiseringsvektoren i xy-planet (Claridge 1999).

Ved å Fourier-transformere overføres dataene fra tidsdimensjonen (intensitet som funksjon av tid) til frekvensdimensjonen (intensitet som funksjon av frekvens), der hver enkelt frekvens svarer til de ulike ^1H -kjernene i en forbindelse (tilsvarende gjelder for andre aktuelle isotoper, men da har vi sendt inn rf-pulser ved deres Larmorfrekvenser) (Claridge 1999).

Grunnen til at samme isotop gir opphav til flere ulike frekvenser er at de har ulike kjemiske omgivelser i molekylene. Elektronene som omgir den enkelte kjerne vil bidra til at det effektive magnetiske feltet kan være annerledes enn for en fri kjerne i det pålagte feltet (B_0) (Friebolin 1990).

Resonansfrekvensene (ν) er avhengige av det pålagte feltet og gjør det vanskelig å sammenlikne ulike spektre. Resonansfrekvensene blir derfor omregnet til kjemisk skift (δ) som er feltuavhengig. Her blir frekvensen sett i forhold til frekvensen til en intern standard (ν_0) (Atkins 1990).

$$\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \cdot 10^{-6} \quad \text{Formel 3.2.1.4}$$

I dette studiet er DSS (2,2-dimetyl-2-silapentan-5-sulfonat) brukt som intern standard. Denne blir ofte brukt i studiet av biopolymerer (Wütrich 1986), fordi DSS er godt vannløselig og ikke er påvirket av temperatur, pH eller ionekonsentrasjon.

3.2.2 Generelt om 2D- og 3D-eksperimenter

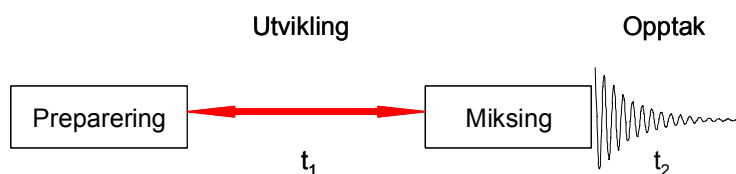
Grunnen til at man ønsker 2D- eller 3D-spektre framfor 1D-spektre er at man kan spre informasjon ut i flere dimensjoner og dermed øke oppløsningen og gjøre tolkningen enklere. Et 2D- eller 3D-spekter har henholdsvis to eller tre frekvensakser, mens intensiteten representerer en tredje eller fjerde dimensjon (Claridge 1999).

Et viktig grunnlag for å oppnå dette er at fasekoherens kan overføres fra et spinn til et annet, også til kjerner av et annet grunnstoff.

Overføringen av fasekoherens kan enten skje mellom spinn som er lenket sammen i en kjede av noen få kovalente bindinger slik at vi får skalare koplinger, eller ved at de er nær hverandre i rommet slik at de kan ha dipol-dipolinteraksjoner. Ulike pulssekvenser kan brukes for å gi slik koherensoverføring (Claridge 1999).

Relaksasjonstidene i NMR er relativt lange sammenlignet med andre spektroskopiske teknikker som f.eks. UV/synlig-spektroskopi og dette gir oss muligheten til å manipulere spinnsystemene etter eksitasjon ved bruk av ulike pulssekvenser.

Et 2D-eksperiment kan grovinndeles i følgende sekvenser:

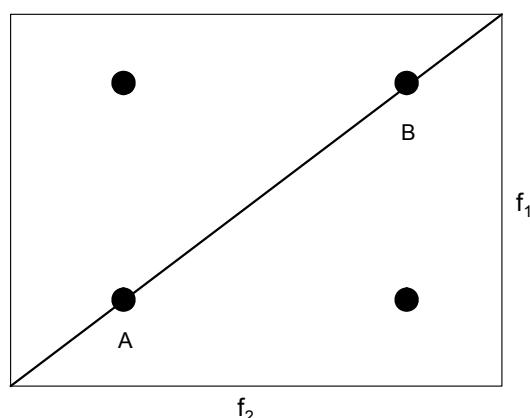


Figur 3.2.2.1

Preparerings- og miksingfasene kan bestå av enkeltpulser eller sekvenser med flere pulser. Ved å samle data som funksjon av to separate tidsvariabler t_1 og t_2 kan man generere et spektrum med to

frekvensdimensjoner f_1 og f_2 , ved først å fourier-transformere i t_2 -dimensjonen som funksjon av tid og deretter i t_1 -dimensjonen (Claridge 1999). T_2 -dimensjonen og f_2 er henholdsvis fid og spekter til direkte observert dimensjon, mens t_1 og f_1 er fid og spekter til den indirekte observerte dimensjon.

I et 2D-spekter vil diagonalen tilsvare f.eks. ^1H -spekteret i en dimensjon, og kryss-toppene utenfor diagonalen hjelper oss til å se hvilke spinn som er koplet til hverandre. Figuren nedenfor illustrerer et 2D-spekter for to komplette spinn A og B.



Figur 3.2.2.2 2D-spekter til to komplette spinn A og B.

3.2.3 NOESY

NOESY (Nuclear Overhauser Effect spectroscopy) er en todimensjonal teknikk som baserer seg på Nuclear Overhauser effekten (NOE).

Kort oppsummert fører NOE til en endring av intensiteten til en resonansfrekvens ved å påvirke spinnovergangen til en annen. Dette gjøres ved å enten utligne forskjellen mellom spinnpopulasjonene eller ved å invertere dem. Etter en endring av spinnpopulasjonene vil systemet prøve å gå tilbake til likevekt ved hjelp av ulike relaksasjonsprosesser. Hvilke relaksasjonsprosesser som vil være dominerende vil være avgjørende for om vi får NOE og om disse vil være positive eller negative. Dette vil være avhengig av størrelsen på molekylene (Claridge 1999).

NOE-effekten oppstår for molekyler med dipolare koplinger slik at man kan få dipol-dipol-relaksasjon. Den dipolare koplingen er omvendt proporsjonal med r^6 , der r er avstanden mellom kjernene, og NOESY-spektre brukes derfor til å finne protoner som er nær hverandre i rommet. Utfra intensiteten til toppene i NOESY-spektre kan man beregne avstanden mellom protoner.

Forutsatt at NOE-toppene utvikler seg med samme vekstfart kan man beregne avstanden r_{AB} mellom to protoner A og B ved hjelp av formelen nedenfor (Claridge 1999).

$$\frac{I_{XY}}{I_{AB}} = \frac{r_{AB}^{-6}}{r_{XY}^{-6}} \quad \textbf{Formel 3.2.3.1}$$

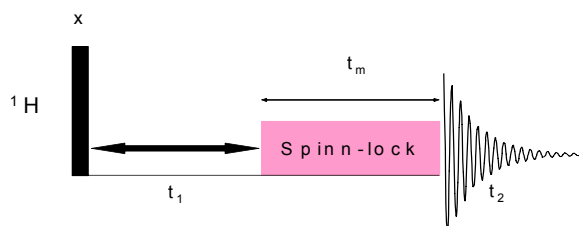
I er intensitetene for krysstoppene til henholdsvis AB og til to referanseprotoner XY der avstanden r_{XY} er kjent (Claridge 1999).

Det er flere problemer som er knyttet til bruk av NOE-data til å kvantifisere avstander. Ulike interne bevegelser i et molekyl vil føre til at NOE-effekten bygges opp med ulik vekstfart for ulike kjerner og deler av molekylet (Claridge 1999). I tillegg vil de ulike avstandene i et molekyl variere over tid fordi molekylet kan ha flere konformasjoner. Størrelsen på NOE-toppene vil være mer vektlagt av korte avstander enn av lange fordi intensiteten er proporsjonal med r^{-6} (Claridge 1999). NOE-topper vil også oppstå på grunn av spinndiffusjon, og ikke direkte koblinger, men dette problemet kan minskes ved å bruke passende mikse-tider (Wütrich 1986). For store molekyler vil nevnte mekanismer ofte føre til en minkning i NOE-toppene, derfor benyttes oftest NOE til å gi oss øvre avstandsbegrensninger og ikke absolutte verdier for avstand mellom atomer (Güntert 2004).

3.2.4 TOCSY

TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) gir oss homonukleære protonkorrelasjonsspektra basert på skalare koplinger og viser korrelasjoner mellom protoner som er i samme spinnsystem, det vil si at de sitter i en kontinuerlig kjede av spinnkoplete (2J - og 3J -koplete) protoner (Claridge 1999).

Denne metoden er særlig fordelaktig å bruke når det er bestemte spinnenheter i molekylet, og benyttes f.eks. mye på oligosakkarider, peptider og protonspektra som inneholder mange overlappende multipletter (Claridge 1999).



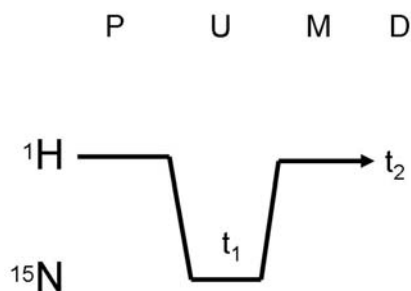
Figur 3.2.4.1 Pulssekvens i TOCSY.

Pulssekvensen til TOCSY (Fig. 3.2.4.1) inneholder en spinn-lock-sekvens (Claridge 1999) hvor det skjer magnetiseringsoverføringer mellom protonene i samme spinnsystem (Claridge 1999). Denne overføringen avhenger av størrelsen på J-koplingene og miksetiden. En relativt lang miksetid (t_m) vil være avgjørende for at man får magnetiseringsoverføring over lengre avstander, men dette må avveies mot at relaksasjonsprosesser samtidig vil redusere signalintensiteten (Cavanagh *et al.* 2007).

3.2.5 HSQC

HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation) gir korrelasjoner over enkeltbindinger mellom heteronukleære kjerner (^1J -kobling), altså får vi en identifisering av kjerner som er koblet direkte til hverandre (Claridge 1999).

Magnetiseringsoverføringen mellom de heteronukleære kjernene skjer ved polarisasjonsoverføring ved bruk av en såkalt INEPT-sekvens (Claridge 1999). I INEPT-sekvensen overføres magnetiseringen fra en mer sensitiv kjerne med stor gyromagnetisk ratie til en mindre sensitiv kjerne med lav gyromagnetisk ratie (Cavanagh *et al.* 2007). En reversert INEPT-sekvens fører så magnetiseringen tilbake til den mer sensitive kjernen (^1H) for deteksjon (Claridge 1999). Figur 3.2.5.1 viser en skjematisk fremstilling av magnetiseringsoverføringene i denne inverse teknikken. En slik protondeteksjon blir brukt for å gi størst mulig følsomhet (Cavanagh *et al.* 2007).



Figur 3.2.5.1 Skjematisk oversikt over magnetiseringsoverføringen i HSQC (basert på Claridge 1999).

HSQC brukes ofte for å se på ^1H - ^{15}N -korrelasjoner i proteiner (Claridge 1999). Da ^{15}N har lav naturlig forekomst kreves lange opptakstider, men ved bruk av ^{15}N -merkete proteiner er HSQC en effektiv teknikk.

3.2.6 Bruk av NMR på peptider og proteiner

Den tredimensjonale strukturen til molekyler kan bestemmes ved teknikker som røntgenkrystallografi og NMR.

Røntgenkrystallografi gir oss en enkelt struktur i motsetning til NMR som gir oss et sett av mulige strukturer som passer dataene. Røntgenkrystallografi krever at man har krystaller av molekylet som skal strukturbestemmes, og det kan dessverre ofte være vanskelig og tidkrevende å dyrke proteinkrystaller da proteiner er store objekter med ujevne overflater (Branden *et al.* 1999). Metodene er komplementære, og man velger ofte NMR på små proteiner som er vanskelige å krystallisere, og når vi ønsker å studere molekyler i løsning, f.eks for å se på dynamiske prosesser som folding.

Det har vist seg at NMR er en nyttig teknikk for å bestemme strukturen til proteiner, selv om det i praksis finnes begrensninger i forhold til størrelsen av proteinet.

NMR-spektrene vil ofte inneholde mange overlappende topper for store molekyler, men introduksjon av 2D-teknikker som COSY og NOESY på begynnelsen av 80-tallet ga en stor økning

av oppløsningen i NMR-spektre til proteiner, hvilket igjen betydde at man kunne få ut mer informasjon av spekterne (Redfield 1993).

Proteiner er store molekyler som gir opphav til mange topper, og størrelsen gjør også at proteinene har kort T_2 -tid som igjen gir brede topper (Reid 1997). Dette gjør at vi velger flerdimensjonale NMR-teknikker når vi skal bestemme strukturen til proteiner.

Merking av molekyler med NMR-aktive isotoper som ^{13}C og ^{15}N gjør at vi kan få spektre med en ekstra dimensjon som er korrespondert til den introduserte isoptopen. For proteiner er det vanlig å kombinere HMQC eller HSQC med TOCSY- og NOESY-eksperimenter (HMQC er en teknikk som bygger på samme prinsipper som HSQC og brukes til å finne kjerner som er direkte tilknyttet, oftest ^1H - ^{13}C (Claridge 1999).

3.2.7 NMR-prøve

Når man utfører NMR-eksperimenter på proteiner løser man som oftest prøven i vann tilsatt 5-10% D_2O for å kunne bruke lock-funksjonen (Claridge 1999) på NMR-instrumentet.

Amidprotonene i kjeden vil ha en kjemisk utveksling med løsemiddelet, derfor må H_2O være tilstede for at en skal se disse protonene i NMR-spekteret. Ulempen med H_2O er intensiteten til vannsignalet, men det er utviklet flere metoder for å undertrykke vannsignalet som f.eks. metning av vannsignalet og PFG (pulsed field gradients) (Reid *et al.* 1997). Mange NMR-eksperimenter utføres også ved lav pH for å få minst mulig grad av protonutveksling mellom proteinet og løsemiddelet slik at protoner i f.eks. amid-gruppene kan observeres (Reid *et al.* 1997).

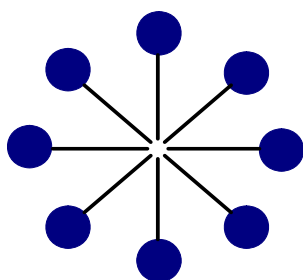
NMR er en lite følsom teknikk og krever prøve-konsentrasjoner på mer enn 0,5 mM. Dette kan gi problemer for proteiner med liten løselighet. Proteiner og andre makromolekyler har også mindre mobilitet enn mindre molekyler hvilket gir bredere topper i NMR-spektre. Det kan derfor være gunstig å utføre eksperimentene ved økte temperaturer for å øke mobiliteten. CD-målinger er som nevnt tidligere en gunstig teknikk for å undersøke temperaturstabiliteten (Reid *et al.* 1997). Ulempen med høy temperatur er at utvekslingen av amidprotoner med løsemiddelet vil øke, men dette kompenseres ved lav pH.

Ved studier av membranproteiner forutsettes det at man har et membranliknende miljø i løsningen. Det er vanskelig å få et slikt miljø til å svare til en naturlig membran, og flere alternativer

er prøvd ut i ulike typer studier. Eksempler på dette er vesicler, miceller, blandete miceller og biceller (Whiles 2002).

Fosfolipid-vesicler har vist seg lite egnet i NMR p.g.a. liten bevegelighet og følgelig at man får bredere topper i spekterne. Miceller er mye brukt i NMR-studier av membranpeptider da de har god bevegelighet i løsning, men har den ulempen at de er sfæriske små partikler, hvilket kan ha betydning for hvordan peptider assosieres i forhold til i en membran (Zhang 2006). Miceller består av flere molekyler med en polar ende og en lengre hydrofob ende som vil orientere seg slik det er framstilt i figur 3.2.7.1, (de polare endene vender ut mot vandig løsning). Dette forutsetter at konsentrasjonen av miceller er høy nok. For DPC-miceller som er brukt i dette studiet er kritisk micelle-konsentrasjon (CMC) 1,1 mM (Stafford *et al.* 1989).

Størrelsen på micellene kan også være et problem i forhold til antall peptider som kan assosieres i en micelle (Zhang 2006).



Figur 3.2.7.1 Skjematisk fremstilling av tverrsnittet til en micelle.

Biceller er et annet alternativ som består av fosfolipider med korte og lange kjeder. Disse danner avlange flate diskler som vil orientere seg i forhold til et magnetisk felt, og egner seg godt til fast-fase NMR (Whiles 2002). Disse har ikke ulempen med krum overflate og egner seg godt til studier av funksjon og struktur til peptider/proteiner i samme system (Whiles 2002). Men treg rotasjon gjør at biceller ikke egner seg godt til NMR-studier av membranproteiner i væske.

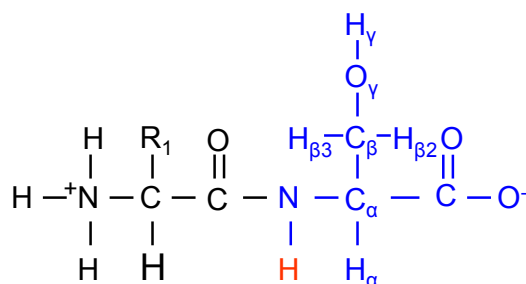
3.2.8 Resonansassignering av proteiner ved NMR-spektroskopi

Assigneringen av NMR-spekterne til proteiner kan baseres på at man kjenner aminosyresekvensen til proteinet, denne metoden har vært kjent siden 1982 og kalles sekvensiell assigneringsprosedyre (Wütrich *et al.* 1982, Billeter *et al.* 1982).

Prosedyren består av to trinn: I det første trinnet identifiserer man systemer av spinn-spinnkoblete resonanser og tilordner disse til bestemte aminosyrer, dette gjøres typisk ved hjelp av TOCSY-eksperimenter. Når man har tilordnet et spinnsystem til å være f.eks. glycin, så vet man foreløpig ikke hvilket glycin i sekvensen spinnsystemet tilhører. Det er ingen spinn-spinnkobling over peptidbindingen slik at det blir en kobling mellom aminosyreresiduene. I trinn to må man derfor bruke informasjon om koblinger gjennom rommet, hvilket gjør at man kan tilordne spinnsystemene i forhold til hverandre. Denne informasjonen kan man få ved hjelp av ulike NOESY-eksperimenter. Bruk av molekyler som er merket med isotoper som ^{15}N og ^{13}C gjør det mulig å bruke spektere fra multidimensjonale NMR-teknikker som f.eks. HSQC-NOESY og HSQC-TOCSY (3-dimensjonale). Dette kan gjøre tilordningen enklere når man jobber med store molekyler som gir opphav til mange topper i NMR-spekterne, ved at informasjonen blir spredt over flere dimensjoner.

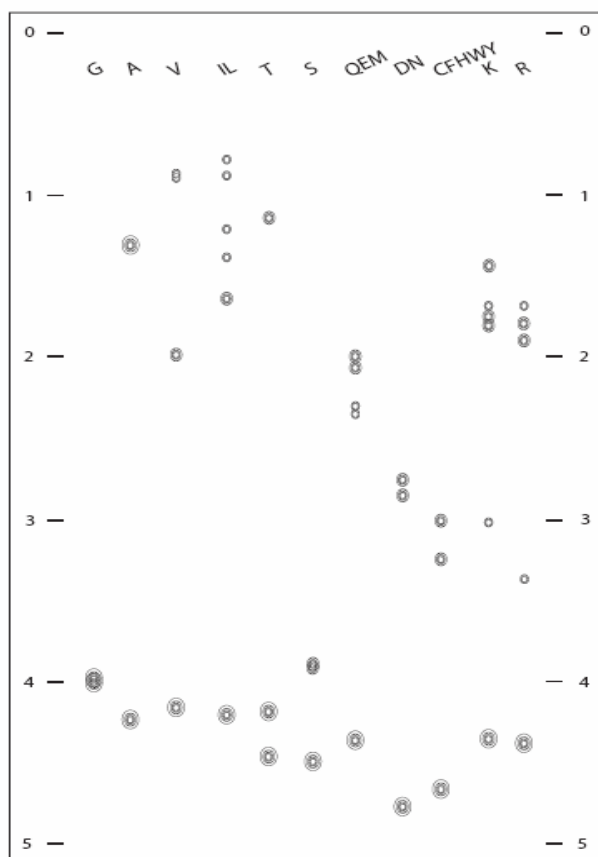
3.2.9 Skift-verdier

Protonskift: I den videre teksten vil det ofte refereres til ”amidprotonet” og da menes amidprotonet ved peptidbindingen (markert med rødt i figur 3.2.9.1) for de ulike residuene. Ellers følges generelle navnsettingsregler for protonene ($\text{H}\alpha$, $\text{H}\beta$, $\text{H}\gamma$) etter plasseringen i aminosyren, her vist for aminosyren serin i blått i figur 3.2.9.1.



Figur 3.2.9.1 Figuren viser et dipeptid der residue 2 (serin) er farget blått og med navnsetting av enkelte kjerner. Amidprotonet til serin i rødt.

Områdene i spekterne hvor vi finner topper fra amidprotonene blir ofte kalt amid-området (typisk i området 7,5 – 10 ppm). Dette er karakteristiske verdier som gjør at man kan skille de ulike spinnsystemene fra hverandre. Vi kan også telle opp antall kryssstopper fra dette området for å vurdere kvaliteten på spektrene, da antallet skal stemme med antall mulige H^{N} -topper fra peptidet (Redfield. 1993). Amidprotonet til aminosyren på den N-terminale enden av peptidkjeden vil ikke sees på grunn av rask kjemisk utveksling med protonene i vann, og prolin har ingen amidprotoner. Sidekjedene til enkelte aminosyrer inneholder NH-grupper som også vil gi opphav til topper i spektrene, skiftverdiene til disse varierer mer enn skiftverdiene for amidprotonene men ligger typisk i området 6 -7,5 ppm. Kjemiske-, fysiske og strukturelle betingelser vil være avgjørende for om man får de tenkelige krysstoppene. For f.eks. NH_3 -gruppen i sidekjeden til lysin vil graden av kjemisk utveksling med løsemiddelet være avgjørende for hvorvidt den gir en krysstopp eller ikke.



Figur 3.2.9.2 Karakteristisk mønster i fingeravtrykksområdet for ulike aminosyrer. Figuren er laget av Per Eugen Kristiansen (2006). Universitet i Oslo.

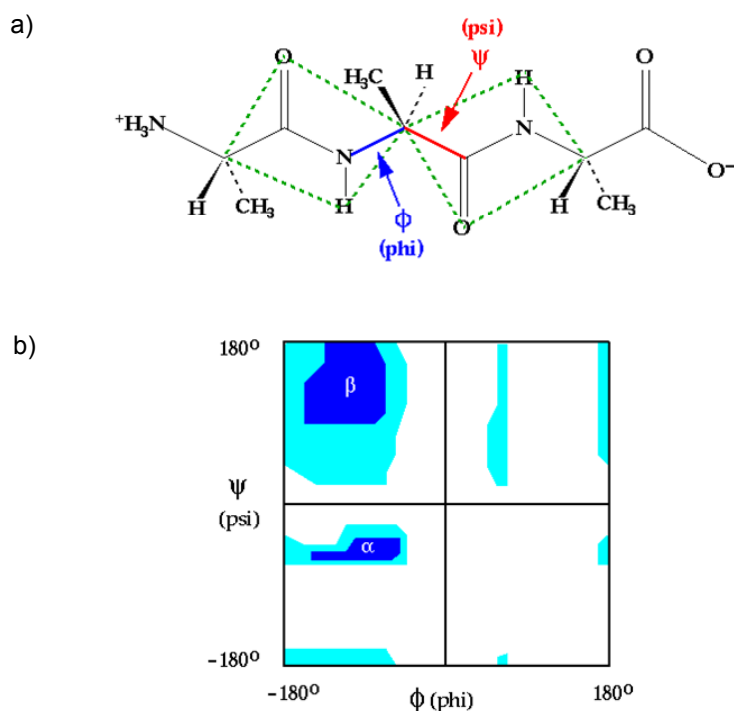
Skift-området hvor vi finner topper fra de alifatiske protonene fra aminosyreresiduen (0,5 - 5 ppm) kalles ofte fingeravtrykksområdet, og hjelper oss til å identifisere spinnsystemene som de ulike aminosyrene gir opphav til (Redfield, 1993). Figur 3.2.9.2 viser karakteristiske mønster i kjemiske skiftverdier for ulike aminosyrer i fingeravtrykksområdet.

Nitrogenskift: For ^{15}N -merkede peptider vil amidnitrogener gi skiftverdier i området 105 – 130 ppm. Aminosyren glycin vil ha spesielt lave verdier for amidprotonet og dette kan være til god hjelp i assigneringen. Nitrogenene i sidekjedene viser enda større variasjon i skiftverdier.

De kjemiske skiftene avhenger av proteiners sekundære struktur. For α -protonene vil skiftverdiene være 0,3 ppm lavere enn gjennomsnittet i en α -heliksstruktur, mens de vil være 0,3

ppm høyere enn gjennomsnittet for β -heliksstruktur (Williamson 1990). Dermed kan man utfra de kjemiske skiftene forutsi den sekundære strukturen. En enkel metode som kan brukes for å gjøre dette kalles *kjemisk skift indeks* (CSI). Her ser man på skiftverdiene til α -protoner. Dersom de er mer enn 0,1 ppm større enn verdien for α -protonet for aminosyren i en ustrukturert triplett får de verdien 1, er de mer enn 0,1 ppm mindre får de verdien -1 og hvis de har samme verdi får de verdien 0. Hvis peptidkjeden har en gruppe -1 –verdier på fem eller mer i rekke har vi en α -heliksstruktur, og hvis vi har en gruppe 1-verdier på tre eller mer i rekke så har vi en β -streng (Wishart *et al.* 1992). Metoden er basert på statistikk og det finnes derfor avvik, men utvidete metoder der man ser på skift fra flere kjerner gir sikrere resultater (Williamson 1997).

TALOS er et program som ved hjelp av en database predikerer phi- og psi-torsjonsvinkler (se figur 3.2.9.3) i proteinhovedkjeden ved å bruke en kombinasjon av ulike skiftverdier (Ha, Ca, Cβ, CO og N) (Cornilescu *et al.* 1999).



Figur 3.2.9.3 i a) viser polypeptidkjede, rotasjonsvinkelen ved N-C α -bindingen kalles phi og rotasjonsvinkelen ved C α -C kalles psi. I b) ser man et såkalt ramachandranplot som viser tillatte kombinasjoner av vinklene psi og phi for rotasjonene av to residuenheter om samme C α -atom. Figurene er hentet fra www.cgl.ucsf.edu. Glasfield, A., Reed College, Glasfield, Portland.

De fleste kombinasjoner av phi og psi er ikke tillatt fordi de ville gitt steriske kollisjoner mellom sidekjeden og hovedkjeden (Branden 1999).

Man bruker ofte protonskift på slutten av en kalkulering når man skal jobbe med finstrukturen til et protein.

Det er også mulig å bruke en endelig struktur til å kalkulere seg tilbake til skiftverdiene men dette gjøres sjelden (Williamson 1997).

3.2.10 NOE-effekter i proteiner:

Det er funnet at for alle sterisk tillatte verdier av torsjonsvinklene ϕ , ψ , χ_1 (sistnevnte refererer til rotasjonsvinkelen om C_α - C_β -bindingen) så er minst en av avstandene mellom H^N , H^α og H^β -protoner i to påfølgende aminosyreresiduer liten nok til å gi en observerbar NOE-effekt (Wütrich *et al.* 1982, Billeter *et al.* 1982, Wütrich 1986).

Torsjonsvinklene vil være bestemmende for hvilke protoner som gi opphav til NOE-effekter, og en bestemt sekundærstruktur vil dermed gi karakteristiske sekvensielle NOE-topper i spektrene. For en β -struktur vil f.eks. avstanden $d_{\alpha N}(i, i+1)$ være kort, 2,2 Å, mens avstanden $d_{NN}(i, i+1)$ vil være lengre, 4,3 Å. I heliksstrukturer så er avstanden $d_{NN}(i, i+1)$ kort, 2,8 Å, mens avstanden $d_{\alpha N}(i, i+1)$ er lengre, 3,5 Å (Wütrich 1986).

Dette gjør at det kan forventes følgende NOE-effekter (gitt i tabell 3.2.10.1 og 3.2.10.2) for de to hovedgruppene av sekundærstrukturer (Whitehead *et al.* 1986, Wütrich 1986).

Tabell 3.2.10.1 Forventede NOE-effekter i α -helikser.

	α-heliks
$H^N H^N(i, i+1)$	sterk
$H^\alpha H^N(i, i+1)$	svak
$H^\alpha H^N(i, i+2)$	middels
$H^\alpha H^N(i, i+3)$	middels
$H^\alpha H^N(i, i+4)$	middels
$H^\beta H^N(i, i+1)$	middels
$H^N H^N(i, i+2)$	middels
$H^\alpha H^\beta(i, i+3)$	sterk til middels

Tabell 3.2.10.2 Forventete NOE-effekter i β -plate-strukturer

	β-plate
$H^N H^N(i, i+1)$	svak
$H^\alpha H^N(i, i+1)$	svært sterk
$H^N H^N(\text{kryss-streng})$	middels
$H^\alpha H^N(\text{kryss-streng})$	middels
$H^\alpha H^\alpha(\text{kryss-streng})$	svært sterk i antiparallelle β -plate- strukturer

3.2.11 Strukturkalkulering fra NMR-data ved hjelp av CANDID og CYANA

De grunnleggende dataene i strukturkalkulering er øvre avstandsgrenser r mellom atomer som man beregner utfra volumet til toppene i NOESY-spektre (Güntert 1986), se avsnitt 3.2.3).

CANDID (combined automated NOE assignment and structure determination module) er software som gir oss effektiv strukturbestemmelse ved automatisert assignering av NOESY-spektre (Hermann *et al.* 2002). De eksperimentelle input-dataene som benyttes er aminosyresekvensen, kjemisk skiftliste fra den manuelle assigneringen og liste med topper fra NOESY-spektre som inneholder krysstoppenes posisjon og volum. Det er vist at 90% av de kjemiske skiftene bør være assignert for å få et pålitelig resultat (Jee *et al.* 2003).

I tillegg kan man ta med eventuelle lister med konformasjonelle begrensninger fra andre kilder. Nedenfor følger noen eksempler:

- Manuelt beregnede avstandsbegrensninger ut i fra volumet til topper i andre spektre ved hjelp av program som CALIBA (del av CYANA) (Güntert *et al.* 1991).
- Vinkelbegrensninger (ϕ , ψ) i hovedkjeden beregnet ut fra statistikk over kjemiske skift ved hjelp av programmet TALOS (Cornilescu *et al.* 1999), se beskrivelse i avsnitt 3.2.9.
- Begrensende bindingsvinkler fra skalare koblingskonstanter (3J) (Güntert 1997). Informasjon om 3J -koplinger mellom HN og H α kan bli funnet ved å integrere toppene i et 3D- ^{15}N - ^1H -HMQC-spekter; HNHA, (Vuister *et al.* 1993). Utfra forholdet mellom toppene i et slikt

spekter kan man beregne koplingskonstanter ved bruk av formelen nedenfor (Vuister *et al.* 1993).

$$\frac{S_{kryss}}{S_{diag}} = -\tan^2(2\pi J_{HH} \zeta) \quad \textbf{formel 3.2.11.1}$$

S_{kryss} og S_{diag} er intensiteten til henholdsvis kryss- og diagonaltopp i HNHA-spekteret og ζ er den tillatte tiden for overføring av magnetisering mellom de to protonene (Vuister *et al.* 1993).

For α -heliks-segmenter vil man typisk finne at $^3J_{H\alpha HN} < 6,0$ Hz, (typisk 4 Hz), for tre eller fire etterfølgende residuer (Wütrich 1986). Utfra koplingskonstantene kan man beregne ϕ -vinkler ved å bruke Karpluslikningene (Karplus 1963, Güntert 1997) .

I CANDID blir NOESY-toppene assignert utfra kriterier som er i samsvar med kjemisk skiftverdi og at avstandsbegrensningene danner et overensstemmende nettverk. (Güntert 2004). Strukturberegningen blir så gjort ved bruk av CYANA torsjonsvinkel-dynamikk, der man benytter en målfunksjon som måler overenstemmelse mellom en struktur og et gitt sett av avstands- og torsjonsvinkelbegrensninger (Güntert *et al.* 1991; 1997). En konformasjon som i stor grad tilfredstiller begrensningene gir en lav målfunksjonsverdi, ideelt sett verdien 0.

De første beregningene gir en foreløpig struktur som blir brukt som input i en ny runde med assigneringer og beregninger. Etter syvende og siste runde er det beregnet 100 mulige strukturer, hvorav de 20 med lavest energi blir beholdt. Energiene blir beregnet ved å bruke molekylodynamikk-simulering hvor de eksperimentelle dataene kombineres med funksjoner for potensiell energi og anvendelse av et kraftfelt (Holde *et al.* 2006). Målet er å finne konformasjonen med lavest potensiell energi (Holde *et al.* 2006).

De endelige resultatene brukes til å evaluere assigneringene, og man går gjerne flere runder med beregninger og revurderinger før man kommer til et godt resultat (Herrmann *et al.* 2002).

4 Materialer og metoder

4.1 Tillaging av ^{15}N -isotop-merket plnE og plnF.

Arbeidet med produksjon og rensing av ^{15}N -merkete peptider er utført av dr. Gunnar Fimland ved Universitet i Oslo, og er derfor ikke beskrevet i denne oppgaven.

4.2 CD-målinger

Målingene ble utført på et Jasco 810-Spectropolarimeter ved bruk av kvartskyvette med veilengde 0,1 cm. Prøvene ble scannet 5 ganger med scanninghastighet 50 nm/min, med datapitch 0,5 nm og med responstid 4 s.

I prøvetillagingen ble det brukt en standard micelleløsning av DPC med konsentrasjon $20,38 \text{ mg/mL}$ og med 0,1% TFA (trifluoreddiksyre). Standardløsninger av plnF og plnE ble begge laget med en konsentrasjon på $1,5 \text{ mg/mL}$ og med 0,1% TFA. Konsentrasjonen av standardløsningene av peptidene ble kontrollert ved å benytte UV/synlig-spektroskopi. Absorbans ble målt ved 280 nm og konsentrasjonen ble deretter beregnet ved hjelp av Beer Lamberts lov (formel 3.1.1) og ekstinksjonskoeffisientene til plnE og plnF. Prøveløsningene ble deretter laget ved fortynninger av disse standardløsningene, der DPC-standard og standardløsning av peptid ble titrert til trinnvis. Konsentrasjonene av peptider og DPC i prøveløsningene er satt opp i tabell 5.1.1 og 5.1.2 sammen med beregningsresultater. Alle prøveløsningene inneholdt 0,1% TFA.

Den første forsøksserien med CD-målinger for både plnE og plnF ble utført ved økende DPC-konsentrasjon ved å trinnvis titrere til mer DPC-standardløsning til prøven. Disse forsøkene ble alle utført ved en konstant temperatur på 20°C .

I den andre forsøksserien for både plnE og plnF ble det tatt opp CD-spektre ved 20, 30, 40, 50 og 60°C , og ved tre ulike konsentrasjoner av DPC.

Andel α -helisitet ble beregnet ved enkeltpunkt- og fullspektrum-metoder beskrevet i avsnitt 3.1. Beregninger på enkelte måledata ble gjort ved bruk av CONTIN, SELCON3 og CDSSTR, og ved bruk av ulike referansesett.

4.3 Tillaging av NMR-prøver

Til NMR-prøven av plantaracin F ble det laget en 1,1 mM løsning av ^{15}N -merket plnF med 10% D_2O , 0,1% TFA, 0,20 mM DSS og 260 mM deuterisert DPC (DPC-38d). Totalt volum av løsningen var på 610 μL .

Til NMR-prøven av plantaracin E ble det laget en 0,5 mM løsning av ^{15}N -merket plnE tilsatt 10% D_2O , 0,1% TFA, 160 mM DPC-38d og 0,20 mM DSS. Dette ga et totalt volum på 400 μL . Konsentrasjonen av plnE var her lavere enn ønsket fordi vi ikke hadde nok merket peptid.

På grunn av svake NOESY-signaler i spekteret ble denne løsningen dampet inn 50% og det ble deretter kjørt nye NMR-målinger med bruk av NMR-rør som er tilpasset et mindre løsningsvolum (SHIGEMI-rør). Konsentrasjonen av plnE økte dermed til ca. 1 mM. Det var spektrene fra disse opptakene som senere ble brukt i assigneringen og til å gi avstandsdata til strukturkalkuleringen.

Det ble også laget NMR-prøve av syntetisk umerket plnE for opptak av 2D-spektre. Her ble det brukt 2,13 mg plnE i en totalt 600 μL løsning med 10% D_2O , 0,1% TFA, 300 mM DPC-38d og 0,20 mM DSS. Konsentrasjonen av plnE i denne løsningen ble 1,0 mM.

4.4 NMR-spektroskopi

NMR-spektrene ble tatt opp på Universitetet i Oslo av Per Eugen Kristiansen på et 600 MHz Bruker instrument (se utstyrsliste) ved 24°C.

3D-HSQC-TOCSY -og 3D-HSQC-NOESY ble utført med pulssekvenser beskrevet av Palmer *et al.* 1991, Kay *et al.* 1992 og Sceucher *et al.* 1994 med miksetider på henholdsvis 60 og 150 ms.

I 2D-NOESY ble det brukt miksetider på 100 og 200 ms, i 2D-TOCSY ble det brukt miksetider på 20, 40, 60 og 80 ms (Bax *et al.* 1985, Hwang *et al.* 1995)

Ved opptak av ^1H -spektre ble det kjørt 8 scan, 512 datapunkter i direkte dimensjon, for N i indirekte dimensjon: 40 datapunkter. For ^1H : 24 scan, 512 datapunkter i direkte dimensjon og 40 datapunkter i indirekte dimensjon.

Pulssekvensene i HSQC er beskrevet av Davis *et al.* 1992. Her ble det brukt 128 datapunkter i indirekte dimensjon og 2048 i direkte dimensjon.

Ved opptak av HNHA-spekter (Vuister *et al.* 1993; 1994) ble det brukt 2048 datapunkter (TPPI 256, 40)

Vannsignalet ble undertrykket ved å bruke excitation sculpturing (Hwang *et al.* 1995) i 2D-spektrerne, og ved metning av vannsignalet i 2D-spektrerne.

Sender var innstilt på 115 ppm for ^{15}N og 4,7 ppm for proton.

Dataene ble prosessert ved å bruke en faseforskjøvet (SSB = 2) qsinebel-windowsfunksjon før Fourier-transformering. Spektrene fikk null-fylling til dobbel størrelse for protondimensjonen, mens størrelsen ble økt til 128 punkter for N-dimensjonen.

4.5 Strukturkalkulering

I 2D-NOESY og 3D-NOESY-spektrerne ble krysstoppene integrert ved bruk av SPARKY assignerings- og integreringssoftware (Goddard *et al.* årstall ikke oppgitt i ref.), og i strukturkalkuleringen med CYANA ble det brukt avstandsbegrensninger beregnet fra disse NOESY-toppene.

I de første omgangene ble CANDID-rutinen brukt for å finne eventuelle feil i assigneringen slik at avstandslistene kunne bli korrigert der dette var nødvendig.

I de siste beregningene ble det brukt torsjonsvinkelbegrensninger beregnet fra TALOS (Cornilescu *et al.* 1999, se avsnitt 3.2.9) og begrensninger beregnet utfra ^3J -koplinger (Claridge 1999) som et tillegg til avstandslistene beregnet fra NOESY-spektrerne.

Informasjon om ^3J -koplinger ble funnet ved integrasjon av toppene i et HNHA-spekter (Vuister *et al.* 1993).

Materialer og metoder

De første rundene med beregninger gav informasjon om feilassigneringer slik at disse kunne rettes opp. Man måtte også være oppmerksom på at CANDID kunne gjøre feilassigneringer for protonskift med like verdier. Det var kun et fåtall slike i vårt tilfelle.

I den siste beregningsrunden ble den automatiserte assigneringsprosedyren ikke brukt, og CYANA-beregninger ble istedet gjort ut i fra endelige lister med avstands- og torsjonsvinkelbegrensninger.

4.6 Utstyr og kjemikalier

Utstyr

J-810 Spectropolarimeter
(JASCO software)

0,5 mm kvartskyvette

600 MHz NMR-instrument Avance II, 4 kanaler H, X, Y, D

CXI, The Bruker 5mm TCI 600 MHz Z-gradient high-Resolution cryoprobe

SHIGEMI-rør
UV-synlig spektrofotometer (UV-160)

Leverandør

Jasco International Co
Tokyo Japan

Starna

Bruker

Bruker

Sigma-Aldrich
Shimadzu

Programvare

SPARKY
TALOS fra NMR-pipe-pakken til National Institutes of Health, Maryland.
CANDID
CD-pro
MOLMOL
ANTHEPROT (ANalyze THE PROTein)

(Goddard *et al.* San Fransisco)
(Cornilescu *et al.* 1999)
(Herrmann. 2002)
(Sreerama *et al.* 2000)
(Koradi *et al.* 1986)
(Deleage *et al.* 1988)

Kjemikalier

Deuteriumoksid (D₂O)
Deuterisert Dodecylphosphocholine (DPC -d₃₈)
Trifluoreddiksyre (TFE)
DSS (Natrium 2,2-dimetyl-2-silapentan-5-sulfonat)
Syntetisk umerket plantaracin E
MilliQ-vann

Aldrich
Isotec
Merck
Larodan AB
GenScript Corp.
Millipore

5 Resultater og diskusjon

5.1 Analyse av plantaracin E og plantaracin F ved Circular Dichroism (CD)-spektroskopi

Både plantaracin E og plantaracin F ble analysert ved Circular Dichroism-spektroskopi ved varierende konsentrasjoner av dodecylphosphocholin (DPC), og ved varierende temperatur. DPC ble brukt for å danne membranliknende omgivelser (miceller) da denne har vært brukt i flere studier av membranaktive kationiske peptider. Miceller er enklere å bruke enn f.eks. liposomer, og DPC-miceller gir membranliknende omgivelser i motsetning til TFE som bare er strukturinduserende (Kristiansen *et al.* 2005, Uteng *et al.* 2003, Shenkarev *et al.* 2002, Fregau-Gallagher *et al.* 1997). DPC er også kommersielt tilgjengelig i deuterert form hvilket er viktig i NMR-analyse.

Resultatene fra beregningene ved bruk av CONTIN, CDSSTR og SELCON3 ble sammenliknet, og det viste seg at CDSSTR viste avvikende resultater i forhold til de to andre metodene. Utfra disse resultatene, tidligere erfaringer beskrevet i avsnitt 3.1 og at CONTIN hadde laveste standardavvik av de tre metodene, er beregningene fra CONTIN gitt i de ulike resultattabellene (tabell 5.1.1-5.1.4).

CD-spekterne og tilhørende beregninger for plnF og plnE i vandig løsning tilsatt 0,1 % TFA og ved 20°C viser at begge peptidene er ustrukturerte i fravær av DPC (figur 5.1.1, 5.1.2, tabell 5.1.1 og tabell 5.1.2). Dette er i tråd med tidligere funn av Hauge *et al.* 1998a. Begge peptidene viste økende prosentvis andel alfaheliks-innhold ved økende andel DPC opptil et molart konsentrasjonsforhold på ca. 200 mellom DPC og peptid. DPC-konsentrasjonen var større enn kritisk micellekonsentrasjon (1,1 mM) i alle prøveløsningene med tilsatt DPC.

PlnF-løsningene har en større prosentandel alfaheliks-struktur enn plnE-løsningene ved de gitte betingelsene.

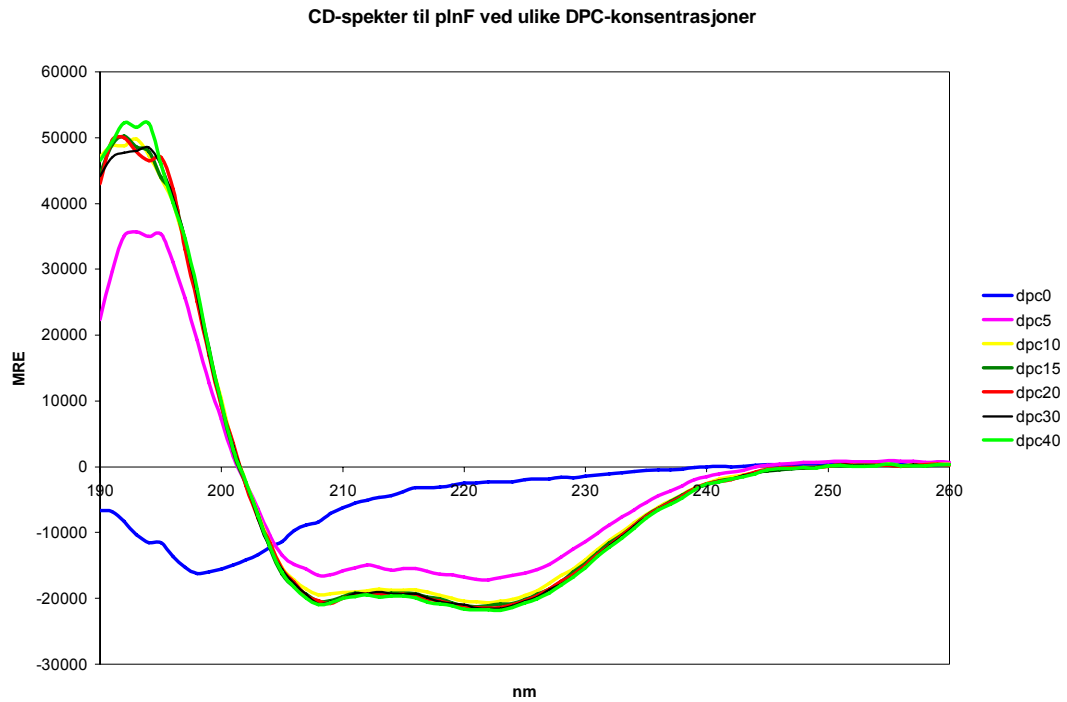
I vårt tilfelle har CD-studiene vært gjort som forarbeid til NMR-spektroskopi for å se på graden av strukturering i ulike konsentrasjoner av DPC og for å undersøke temperaturstabiliteten til strukturen. Derfor ble det laget løsninger som ble gjort sure ved å tilsette 0,1% TFA (pH = 2,8), hvilket var betingelsene som også ble brukt ved opptak av NMR-spektre (stabiliserer peptidene).

Resultater og diskusjon

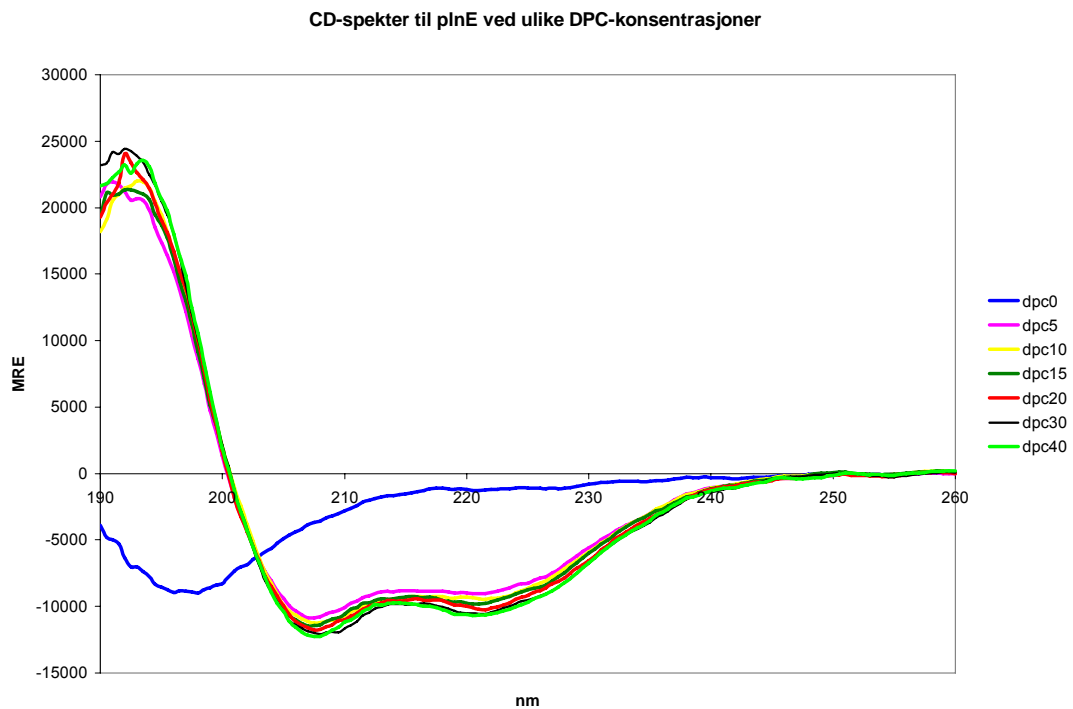
Tidligere CD-studier av plnE og plnF (Hauge *et al.* 1998a) har vært utført i bufrete fosfatløsninger med pH (pH 5,3), og det er interessant å registrere at disse studiene viste at heliksinholdet i plnF-løsninger var under halvparten av heliksinholdet i tilsvarende plnE-løsninger. Mens det i dette studiet er et omvendt forhold. Sammenlikningen er gjort ut i fra beregnet α -heliksinhold ved bruk av enkeltpunktmetoden, da denne metoden har vært brukt i begge studiene. Sammenlikningen er også gjort ut i fra forsøkene der Hauge *et al.* 1998a har brukt molart konsentrasjonsforhold mellom DPC og plnF/plnE på 100.

Struktureringen av plnF var generelt mye lavere i forsøkene til Hauge *et al.* 1998a, mens dette studiet viser at plnF har mye strukturering både utfra CD-analysen og som senere også blir vist i NMR-analysen. Det er ennå ikke gjort studier som viser sammenhengen mellom graden av strukturering og pH eller ionekonsentrasjon for disse peptidene.

Resultater og diskusjon



Figur 5.1.1 CD-spektrere til plnF ved ulike DPC-konsentrasjoner



Figur 5.1.2 CD-spektrere til plnE ved ulike DPC-konsentrasjoner

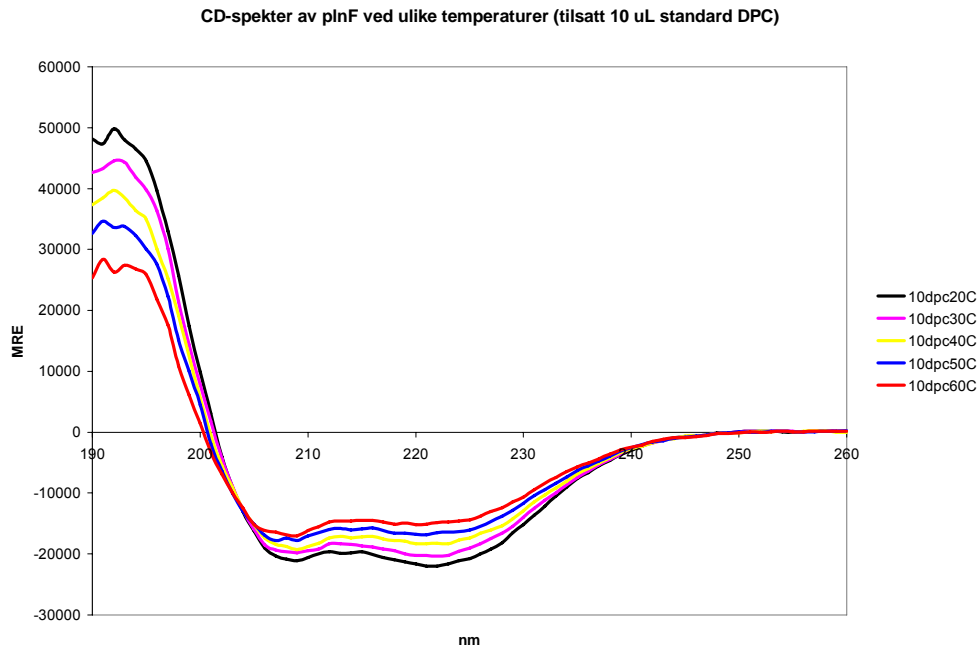
Tabell 5.1.1 Andel helisitet (%) til plnF ved ulike konsentrasjoner av DPC ved 20 °C (α_r og α_d representerer henholdsvis regulær α -heliks og 3^{10} -heliks).

	[DPC] mg/mL	[plnF] mg/mL	$c[DPC]/c[plnF]$ (molart)	Fullspektrum- metode $\alpha_r + \alpha_d$	Enkelt- punktmetode 222 nm	Antall residuer i α -heliksstruktur basert på enkelt-punktmetoden
dpc0	0	0,107	0	9	5	2
dpc5	0,703	0,103	72	56	40	14
dpc10	1,36	0,100	140	67	48	16
dpc15	1,97	0,0968	220	68	49	17
dpc20	2,55	0,0938	290	67	50	17
dpc30	3,60	0,0882	430	68	50	17
dpc40	4,53	0,0833	570	68	50	17

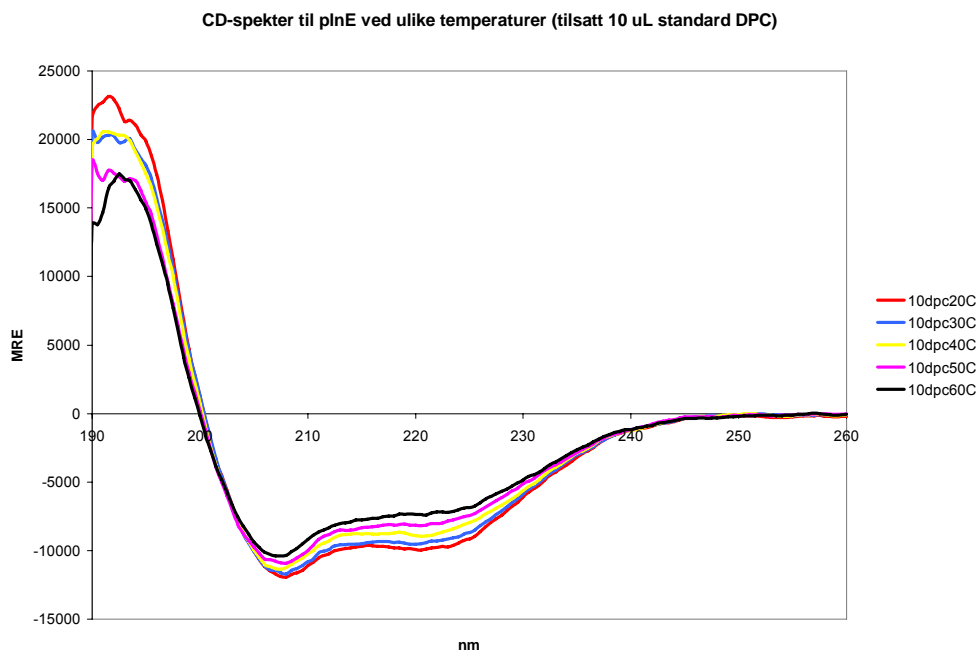
Tabell 5.1.2 Andel helisitet (%) til plnE ved ulike konsentrasjoner av DPC ved 20 °C (α_r og α_d representerer henholdsvis regulær α -heliks og 3^{10} -heliks).

	[DPC] mg/mL	[plnE], mg/mL	$c[DPC]/c[plnE]$ (molart)	Fullspektrum- metode $\alpha_r + \alpha_d$	Enkelt- punktmetode 222 nm	Antall residuer i α -heliksstruktur basert på enkelt-punktmetoden
dpc0	0	0,107	0	5	0	0
dpc5	0,703	0,103	69	32	21	7
dpc10	1,36	0,100	140	39	22	7
dpc15	1,97	0,0968	200	35	22	7
dpc20	2,55	0,0938	270	38	23	8
dpc30	3,60	0,0882	410	38	24	8
dpc40	4,53	0,0833	550	39	24	8

CD-målingene som ble gjort ved tre ulike konsentrasjoner og ved økende temperatur, viser at alfaheliksinnholdet til begge peptid-løsningene avtar til omtrent halvparten ved en temperaturøkning fra 20 - 60 °C, men viser likevel at det fortsatt er endel alfaheliksstruktur ved 60 °C, og peptidene kan derfor anses for å være rimelig varmestabile. Her er det valgt å vise CD-spekter kun ved en konsentrasjon av DPC for plnF og plnE (figur 5.1.3, 5.1.4.), og heller vise hvordan graden av strukturering varierer med ulike temperaturer i grafene i figur 5.1.5.

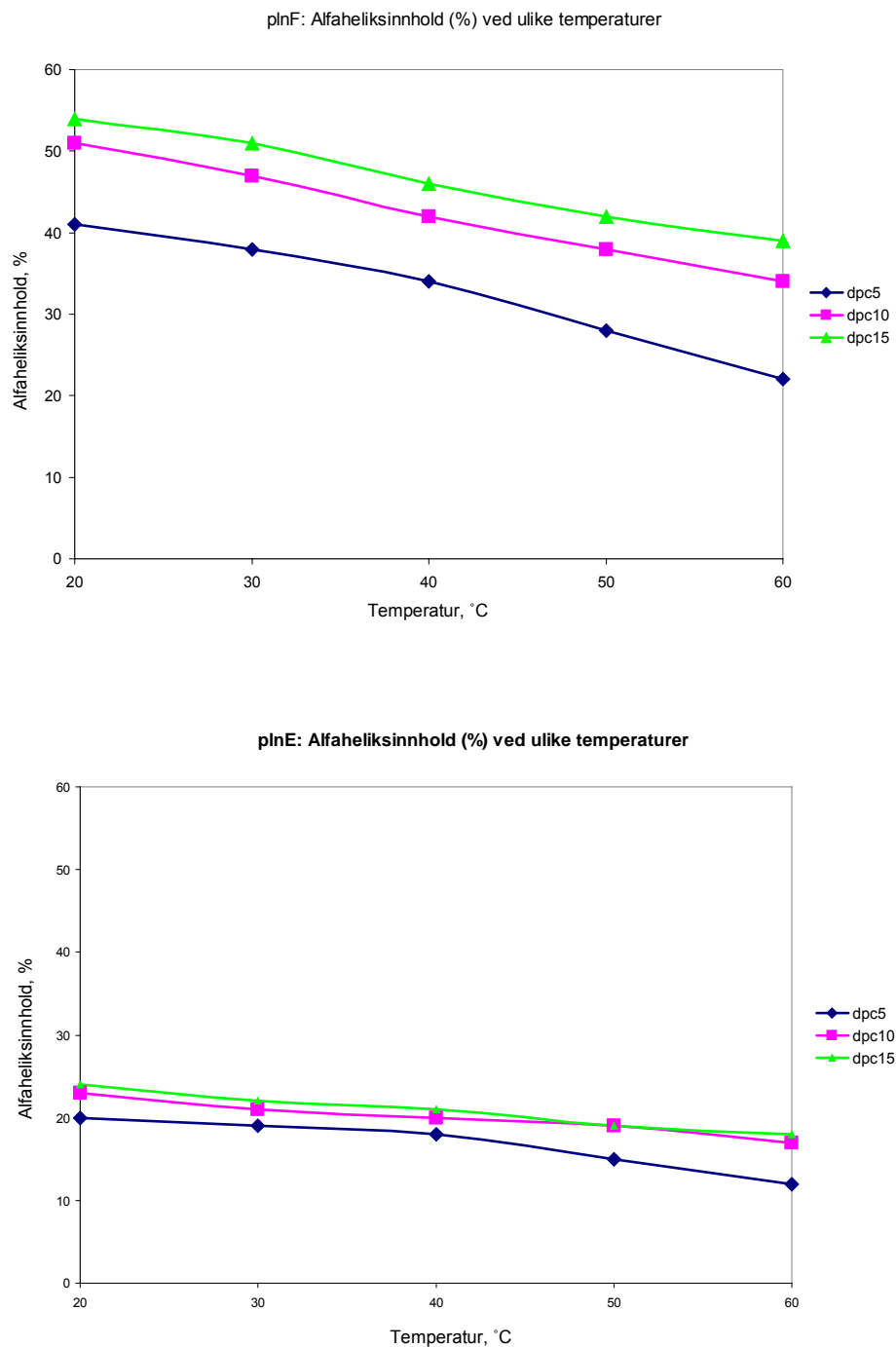


Figur 5.1.3 CD-spekter for plnF ved ulike temperaturer, og et molart konsentrasjonsforhold mellom DPC og peptid på 140 (se tabell 5.1.3).



Figur 5.1.4 CD-spekter for plnE ved ulike temperaturer, og et molart konsentrasjonsforhold mellom DPC og peptid på 140 (se tabell 5.1.4).

Resultater og diskusjon



Figur 5.1.5 Grafiske framstillinger som viser hvordan α -heliksinnholdet til plnF (øverst) og plnE, beregnet utfra enkelpunktmetoden, varierer med temperatur. Grafene viser variasjonen ved tre ulike konsentrasjoner av DPC.

Tabell 5.1.3 Andel helisitet (%) til plnF ved ulike temperaturer
 (α_r og α_d representerer henholdsvis regulær α -heliks og 3^{10} -heliks).

[DPC] mg/mL	[plnF], mg/mL	c[DPC]/c[plnF] (molart)	Temp.	Fullspektrum- metode $\alpha_r + \alpha_d$	Enkelt- punktmetode 222 nm	Antall residuer i α -heliksstruktur basert på enkelt- punktmetoden
"dpc5" 0,703	0,103	72	20°C	55	41	14
			30°C	52	38	13
			40°C	49	34	12
			50°C	41	28	10
			60°C	32	22	7
"dpc10" 1,36	0,100	140	20°C	67	51	17
			30°C	62	47	16
			40°C	61	42	14
			50°C	55	38	13
			60°C	52	34	12
"dpc15" 1,97	0,0968	220	20°C	71	54	18
			30°C	62	51	17
			40°C	61	46	16
			50°C	55	42	14
			60°C	52	39	13

Tabell 5.1.4 Andel helisitet (%) til plnE ved ulike temperaturer
 (α_r og α_d representerer henholdsvis regulær α -heliks og 3^{10} -heliks).

[DPC] mg/mL	[plnE], mg/mL	c[DPC]/c[plnE] (molart)	Temp.	Fullspektrum- metode $\alpha_r + \alpha_d$	Enkelt- punktmetode 222 nm	Antall residuer i α -heliksstruktur basert på enkelt- punktmetoden
"dpc5" 0,703	0,103	69	20°C	34	20	7
			30°C	31	19	6
			40°C	29	18	6
			50°C	26	15	5
			60°C	20	12	4
"dpc10" 1,36	0,100	140	20°C	36	23	8
			30°C	34	21	7
			40°C	35	20	7
			50°C	33	19	6
			60°C	31	17	6
"dpc15" 1,97	0,0968	200	20°C	36	24	8
			30°C	36	22	7
			40°C	36	21	7
			50°C	36	19	6
			60°C	31	18	6

Ved vurdering av CD-resultatene er det viktig å ta i betraktning at vi måler et gjennomsnitt for struktureringen av alle peptidene i løsningen. Peptidene vil veksle mellom å være strukturert i ”membranen” og å være ustrukturert i løsning. Endring av temperatur er en parameter som kan forskyve denne likevekten. Som eksempel kan man nevne hovedfagsoppgaven til Uteng (2002). Her viser CD-studiene av SakP(N24C +44C) et prosentvis lavere alfaheliksinnhold enn NMR-analysene.

Resultatene gir oss altså ikke alfaheliksinnholdet i *ett* enkelt strukturert peptid. Beregnet antall residuer i alfaheliks ved bruk av enkeltpunktsmetoden er likevel tatt med som en illustrasjon (tabell 5.1.3 og 5.1.4).

CD-analysen av plnE- og plnF-løsningene viser at plnF har dobbelt så mye alfaheliksstruktur som plnE, og dette kan skyldes at det enkelte plnF-molekyl er mer strukturert, eller at peptidene har ulik grad av assosiering i micellene. I tillegg inneholder plnF ett tryptofanresidue (plnE er trp-fri) som har sterke absorpsjonsbånd ved 280 og 219 nm, og dette kan gi et lite bidrag til beregnet alfaheliksinnhold (plnF-beregningene ved bruk av enkeltpunktmotoden for løsningen uten tilsatt DPC gir en verdi på 5%, mens det er tilsvarende 0% i plnE).

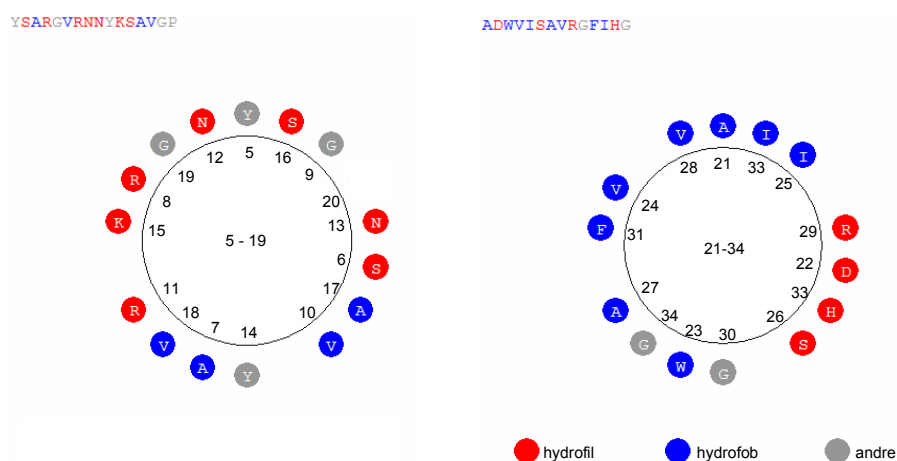
Utfra den grafiske framstillingen i figur 5.1.3, og ved å beregne prosentvis endring kan man se at struktureringen av plnF varierer noe mer med både DPC-konsentrasjon og temperatur enn plnE. I tillegg viste som tidligere nevnt studiene til Hauge *et al.* 1998a et lavere alfaheliksinnhold for plnF ved CD-analyse i bufret løsning, noe som kan tyde på at plnF-strukturene er mer påvirket av betingelser som pH/evt ionekonsentrasjon, micellekonsentrasjon og temperatur enn plnE. I dette studiet er det ikke gjort nok undersøkelser til å trekke konklusjoner, men dette er noe som eventuelt kan undersøkes nærmere.

5.2 Helikshjul-representasjoner

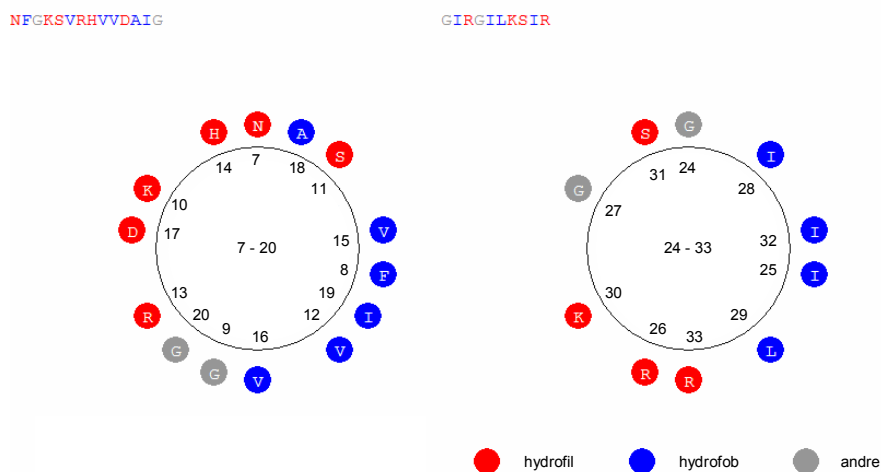
Helikshjul-representasjoner av de ulike peptidene ble laget ved hjelp av programmet ANTHEROT (Deleage *et al.* 1988). Disse viste at det var flere områder i peptidene som kan gi amfifile helikser. I figurene 5.2.1 og 5.2.2 har er det vist noen eksempler.

For plnF viser figur 5.2.1 muligheter for amfifil α -heliks i residueområdet 5-19 og 21-34. Dette stemmer godt overens med CD-resultatene, som viser at plnF har stor andel alfa-heliks. (En helikshjulrepresentasjon av hele området 6-30 viste ikke amfifil heliks).

For plnE viser figur 5.2.2 at det er muligheter for amfifil alfa-heliks i residueområdet 7-20 og 24-33.



Figur 5.2.1 Helikshjul-representasjoner av plnF i området 5-20 og 21-34. Begge representasjonene viser muligheter for amfifile heliksområder. Figuren er laget ved hjelp av ANTHEROT (Deleage *et al.* 1988).



Figur 5.2.2 Helikshjul-representasjoner av residue 7-20 og 24-33 for *plnE*. Begge representasjonene viser mulighet for amfifil alfaheliks. Figuren er laget ved hjelp av ANTHEPROT (Deleage *et al.* 1988).

5.3 Resonansassignering av *plnF* og *plnE*.

I denne beskrivelsen er det valgt å vise hovedlinjene i det arbeidet som har vært gjort i resonansassigneringen. Enkelte assigneringer har vært spesielt problematiske og tidkrevende på grunn av overlappende områder i spektrene, men en mer generell beskrivelse anses å være mer illustrerende for leseren.

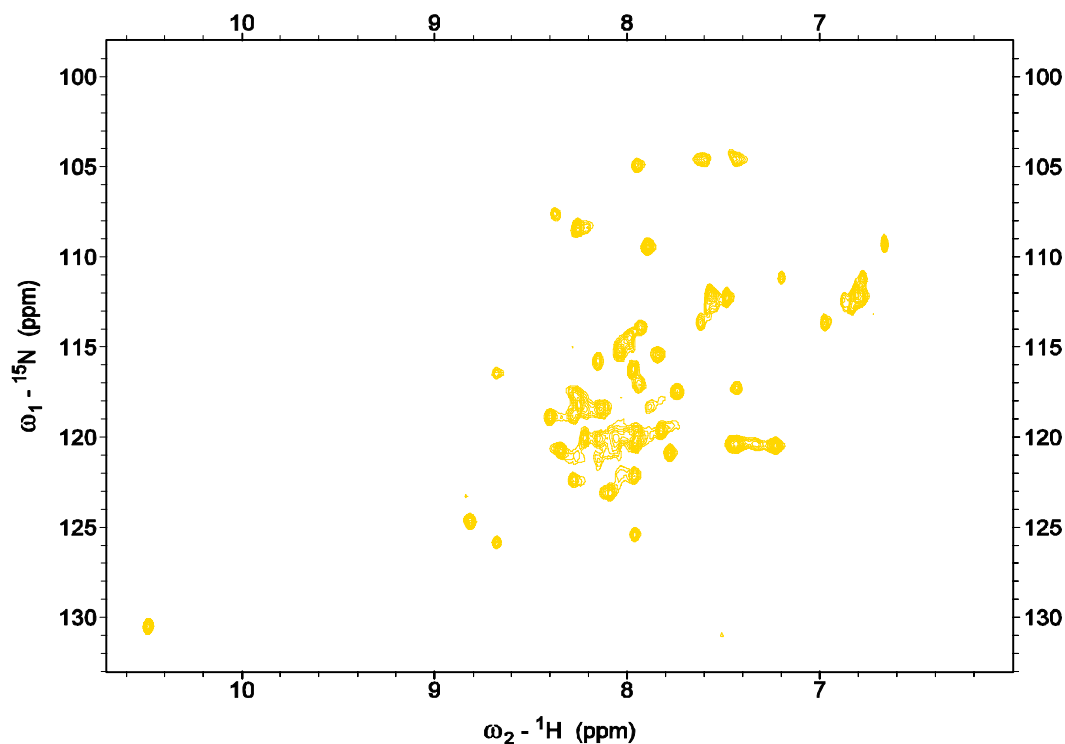
I resonansassigneringen av *plnF* og *plnE* ble det brukt samme framgangsmåte, og dette vil bli illustrert ved å vise resonansassigneringen av enkelte av aminosyrene i *plnF*. Lister over alle skiftverdier og assigneringer ligger i vedlegg 2 og 3.

Resonansassigneringen ble gjort ved hjelp av Sparky NMR-assignering og integreringssoftware (Goddard *et al.* årstall ikke oppgitt i ref.) og ved veiledning ut fra kjemisk skiftverdier i uordnete proteinkjeder oppgitt i Biological Magnetic Resonance Data Bank (Seavey *et al.* 1991).

I HSQC-spekteret (figur 5.3.1) til plnF ga krysstoppene skiftverdiene til nitrogenkjerner og tilhørende protoner i NH-grupper. Disse toppene stammer både fra amidgruppen i hovedkjeden av peptidet og fra NH-grupper i sidekjedene. PlnF består av 34 aminosyrer, hvorav en aminosyre er prolin og en aminosyre er N-terminal. Hovedkjeden vil dermed gi opphav til 32 topper i HSQC-spekteret. I tillegg har plnF flere aminosyrer med nitrogen i sidekjeden. Disse aminosyrene er arginin, asparagin, histidin, lysin og tryptofan. Dette betyr at man kan forvente opp mot 50 topper i HSQC-spekteret.

Skiftverdiene fra toppene i HSQC-spekteret ble notert og brukt som utgangspunkt for å finne topper i de 3-dimensjonale TOCSY-HSQC- og NOESY-HSQC-spektrene. I den følgende beskrivelsen vil det bli gitt konkrete eksempler fra assigneringen.

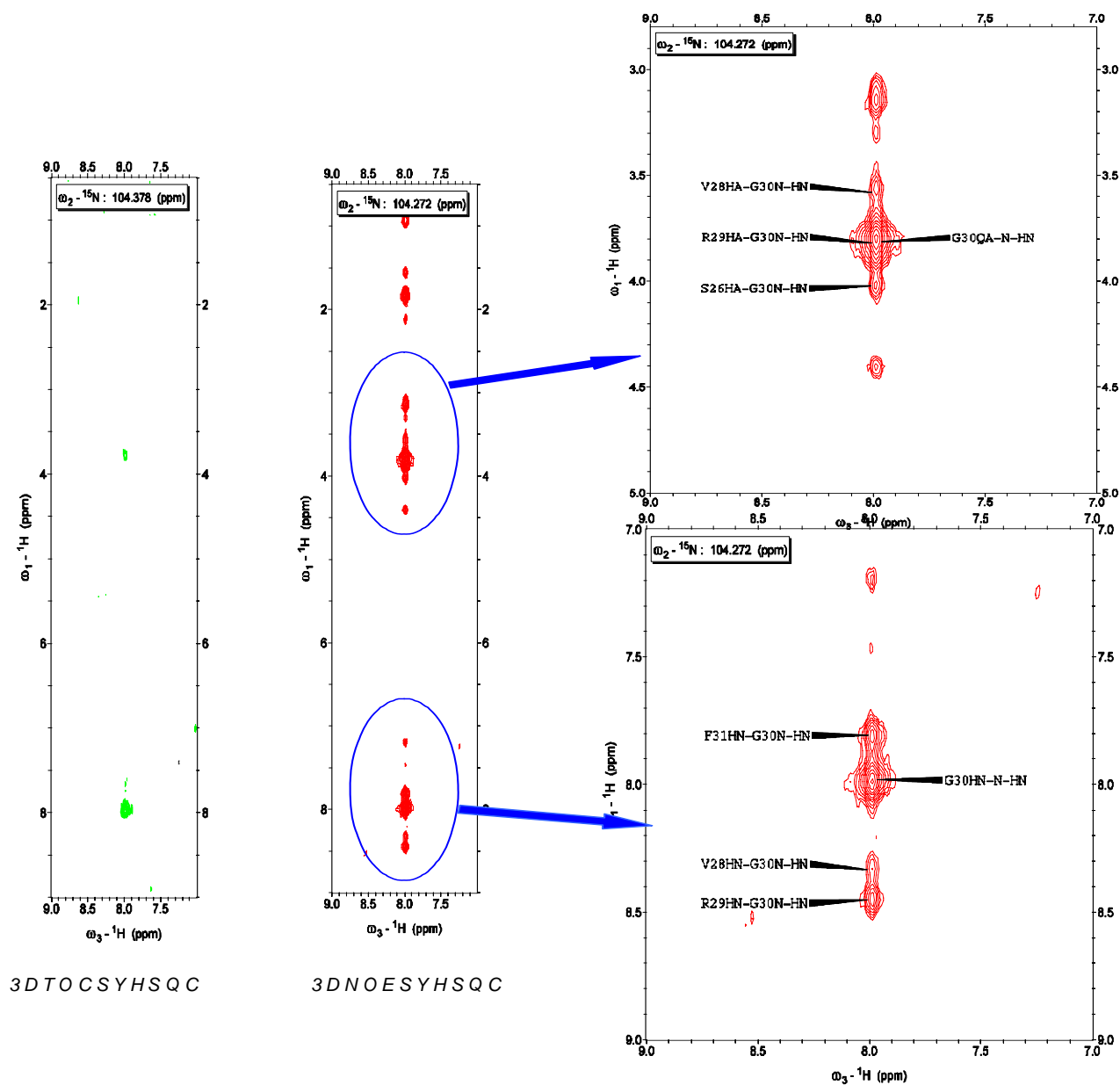
Glycin har som nevnt i avsnitt 3.2.9 karakteristisk lave skiftverdier for amidnitrogenet (103-110 ppm), og da plnF inneholder fire glycin var det greit å starte assigneringen fra topper ved disse skiftverdiene. Som man ser i HSQC-spekteret i figur 5.3.1 er det flere enn fire topper i dette området, og man kunne anta at de overstigende toppene har opphav i sidekjedene. Man måtte i tillegg være oppmerksom på at enkelte topper kunne være overlappende.



Figur 5.3.1 HSQC-spekter for *plnF*.

Ved å se på 3D-TOCSY-HSQC-spekteret i de samme nitrogenskiftområdene, kunne man finne topper fra protoner i samme spinnsystem, det såkalte fingeravtrykksområdet. For glycine forventes det å være en eller to topper fra de to H α -protonene i området rundt 4 ppm. Som eksempel er det i 3D-TOCSY-HSQC-spekteret i figur 5.3.2 på neste side vist TOCSY-toppene fra glycine 30 i *plnF*, dette glycinet har nitrogenskiftverdi ved 104,3 ppm.

Resultater og diskusjon



Figur 5.3.2 Figuren viser TOCSY-HSQC-topper for glycine-30 i *plnF* (grønt). 3D-NOESY-HSQC-spekteret (rødt) viser tilknytninger mellom glycine-30 og naboresiduer i amid- og fingeravtrykksområdet, begge områdene er vist forstørret.

3D-TOCSY-HSQC-spekteret gir oss ingen informasjon om tilknytninger mellom de ulike residuene, slik at man ikke kunne vite hvilket glycin i kjeden disse toppene tilhørte. Derfor måtte man gå videre for å se på det samme området i 3D-NOESY-HSQC-spekteret, her illustrert i figur 5.3.2.

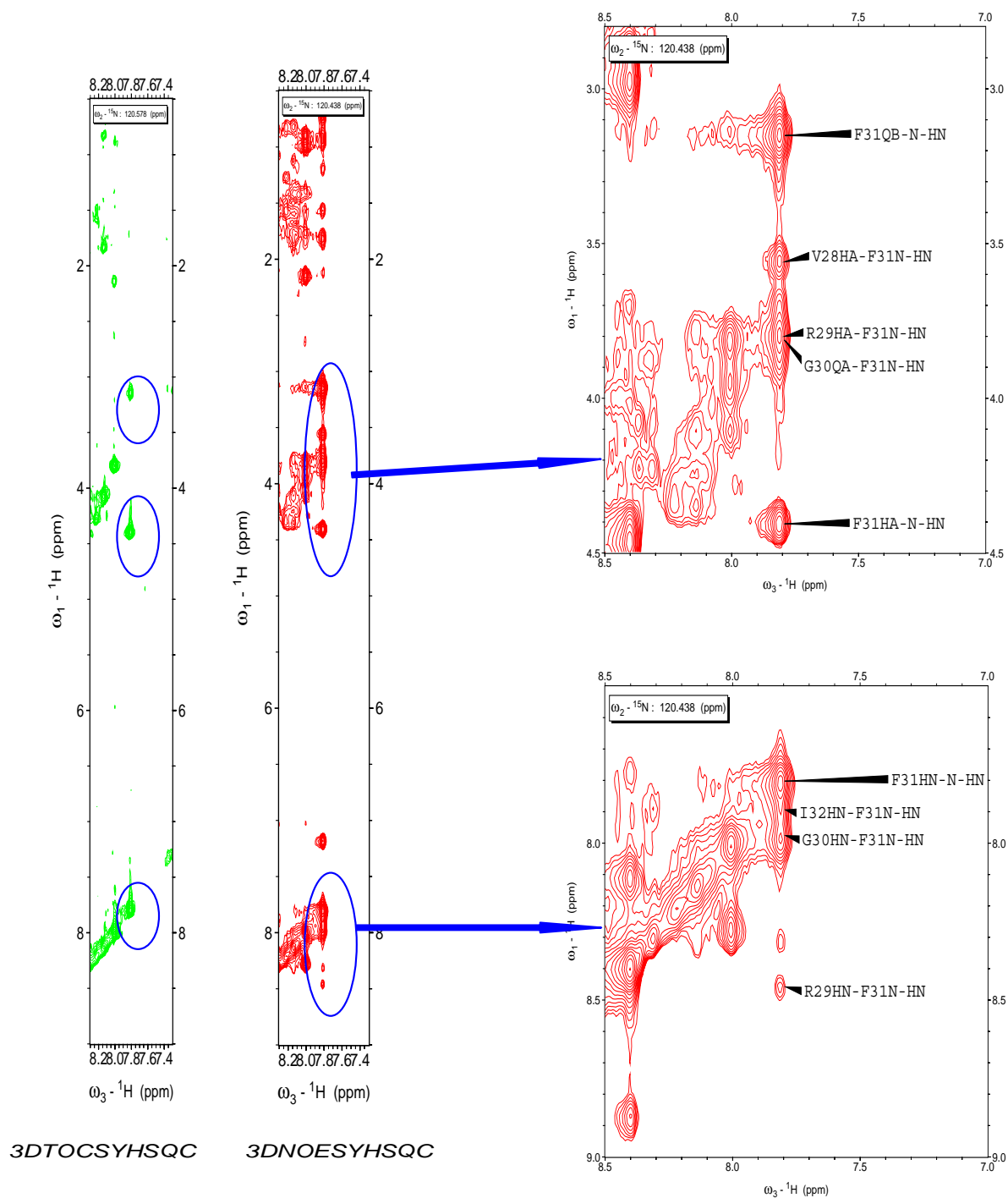
Her så man i første omgang etter kryssstopper av typen $H_N H_N(i, i+1)$ i amidområdet som kunne lede oss over til aminosyrene som er bundet til glycin. I figur 5.3.2 ser man flere slike kryssstopper. Disse skiftverdiene ble notert og i HSQC-spekteret kunne man finne forslag til topper som korresponderte til disse verdiene. For eksempel ble det funnet en topp ved (7,8, 120,4).

Ved igjen å gå over til 3D-TOCSY-HSQC-spekteret ved krysstopp ved 7,8 og 120,4 ppm, kunne man utfra mønsteret i TOCSY-toppene og kjennskap til aminosyresekvensen til plnF avgjøre om dette kunne være en nabo til en glycin. Dette var ikke alltid like enkelt da TOCSY-spekteret i varierende grad for de ulike aminosyreresiduene ga de forventede toppene. Dette kan skyldes effekter av overføringstid og relaksasjon under mikse-sekvensen i TOCSY.

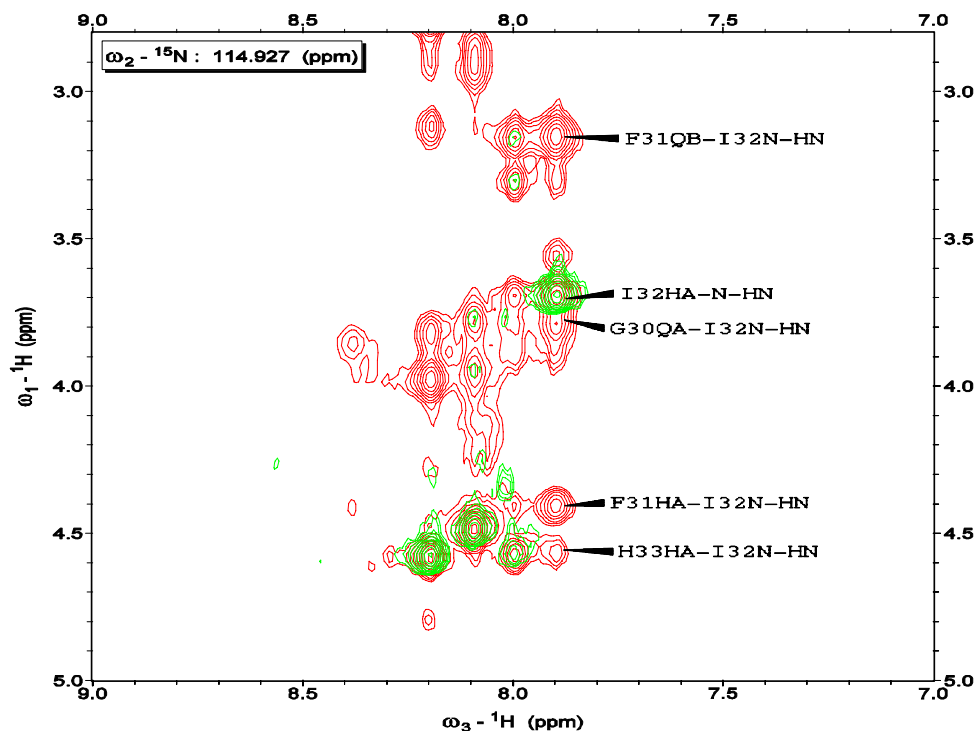
I 3D-TOCSY-HSQC-spekteret fant man at toppene ved 7,8 og 120,4 ppm hadde fingeravtrykks-verdier ved 4,4 og 3,15 ppm. I plnF er glyciner direkte bundet til følgende aminosyrer: arginin, fenylalanin, histidin, prolin og valin. Utfra typiske verdier i fingeravtrykksområdet kunne man utelukke valin, og prolin var utelukket fordi den ikke har et amidproton. For arginin ville man også forvente verdier rundt 1,8 og 1,6. Dermed sto en igjen med mulighetene fenylalanin-31 og histidin-33 som er naboer til henholdsvis glycin-30 og glycin-34.

Underveis i assigneringen av peptidet ble det ofte funnet flere mulige naboer da flere av aminosyrene har overlappende amidprotonskift. Dermed måtte antagelsene bekreftes av flere andre topper, f.eks. av typen $H_\alpha H_N(i, i+1)$ som er typiske for α -helikser. I dette tilfellet ble toppen ved 120,4 assignert til å være fenylalanin-31. Dette ble blant annet bekreftet ved at fenylalanin viste tilknytning til α -protonet til glycin-30 (se figur 5.3.3). I tillegg ledet NOESY-toppene til fenylalanin-31 videre til isoleucin-32. Isoleucin-32 viser igjen tilknytninger til α -protonet til fenylalanin-31, og i tillegg ser man her en annen typisk α -helikstilknytning, $H_\beta H_N(i, i+1)$, mellom F-31 og I-32 i 3D-NOESY-HSQC-spekteret (figur 5.3.4).

Resultater og diskusjon



Figur 5.3.3 Figuren viser 3D-TOCSY-HSQC-topper (grønt) for fenylalanin-31. 3D-NOESY-HSQC-spekteret (rødt) viser tilknytninger mellom fenylalanin-31 og naboresiduer i amid- og fingeravtryksområdet.



Figur 5.3.4 3D-TOCSY-HSQC (grønt) og 3D-NOESY-HSQC (rødt) for Ile 32 i plnF.

Ved å arbeide seg fram på denne måten fikk man etterhvert grupper av påfølgende aminosyrer som var assignert i peptidet. Aminosyrene glycin og serin var gode utgangspunkter. Glycin p.g.a. av de karakteristisk lave nitrogenskiftverdier i amidområdet og at den i tillegg er karakterisert ved en enkelt-topp, eller to topper med relativt like verdier i fingeravtryksområdet. Serin er karakteristisk da β -protonet har en verdi nær 4. Noen aminosyrer var vanskeligere å assignere fordi det enten var overlapp i skiftverdiene, fordi 3D-TOCSY-HSQC-spekteret ikke ga alle forventede topper eller fordi skiftverdier var endel forskjøvet i forhold til tabellskiftverdiene for uordnete kjeder. Det ble enklere å assignere disse etterhvert som antall uassignerte topper minsket.

Etter at en god del av assigneringene var på plass ble også 2D-NOESY- og 2D-TOCSY-spektre tatt i bruk.

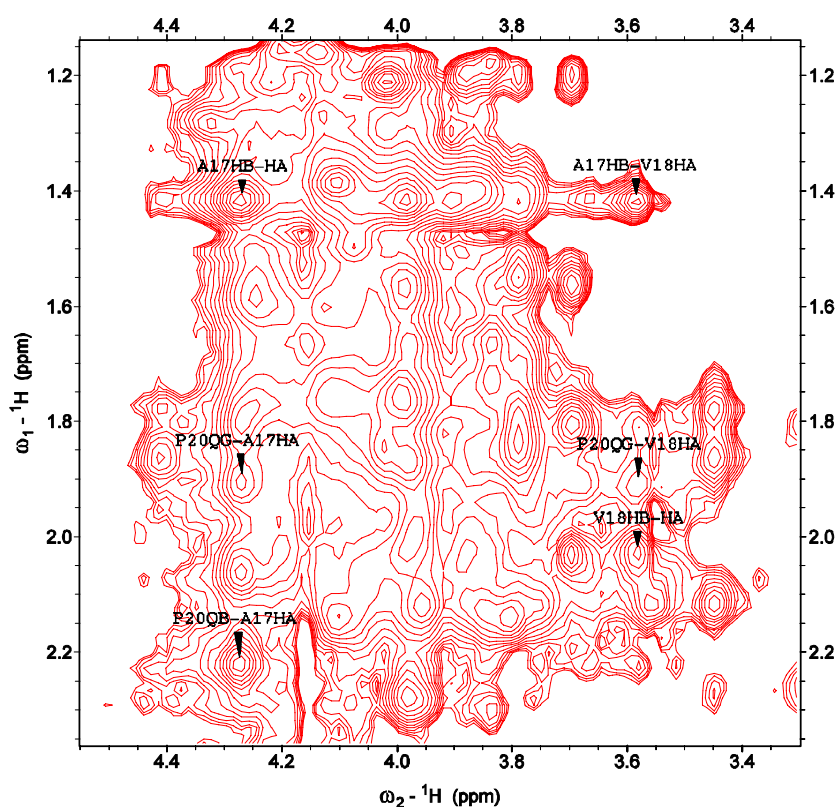
2D-spektrene var til god hjelp i arbeidet med å tilordne spinnsystemene, og det var også nødvendig å få med assigneringer fra 2D-NOESY-spekteret til bruk i kalkuleringen.

I 2D-NOESY-spektre ble det funnet tilknytninger som man ikke finner i 3D-NOESY-HSQC. Eksempel på dette er krysstopper mellom $H\alpha_i$ og $H\beta_{i+3}$ som kan forventes for α -heliksstrukturer.

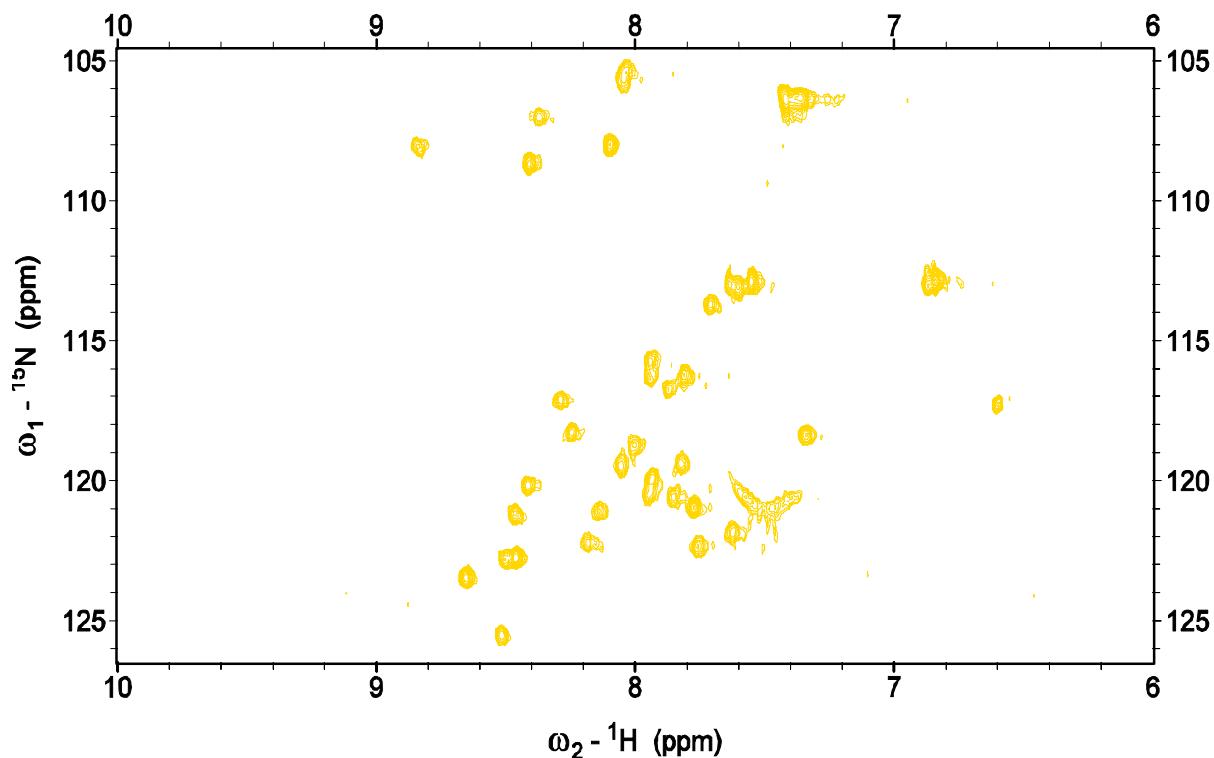
Figur 5.3.5 viser 2D-NOESY-spekter til plnF i fingeravtryksområdet. Her vist med noen krysstopper som ble assignert, eks. $H\beta_{\text{PRO20}}-H\alpha_{\text{ALA17}}$ og $H\beta_{\text{ALA17}}-H\alpha_{\text{VAL18}}$, disse representerer noen typiske tilknytninger for α -helikser (se forøvrig tabell 3.2.10.1), og er viktige å assignere til bruk i strukturkalkuleringen.

Legg forøvrig merke til at 2D-NOESY-spekteret inneholder mange overlappende topper, og samtidig bruk av 2D-TOCSY-spekteret var en nødvendighet.

I noen tilfeller var det vanskelig å avgjøre om en topp kunne bestå av flere overlappende topper, slik at man måtte bruke kunnskaper om hvilke topper man kan forvente å finne utfra struktur (tabell 3.2.10.1), og ikke utelukkende se på muligheten utfra skiftverdier.



Figur 5.3.5 2D-NOESY-spekter for plnF. Her vist med enkelte krysstopper for alanin17 og valin18.



Figur 5.3.6 HSQC-spekter til plnE.

Assigneringen av plnE ble gjort på tilsvarende måte, men med utgangspunkt i HSQC-spekteret (figur 5.3.6) kan man påpeke noen forskjeller. PlnE inneholder ett residue mindre enn plnF, og har i tillegg færre residuer som inneholder nitrogen i sidekjeden. Som man kan se i HSQC-spekteret til plnE inneholder dette færre topper enn HSQC-spekteret til plnF. Dette gav et enklere utgangspunkt for assigneringen av plnE-spekterne.

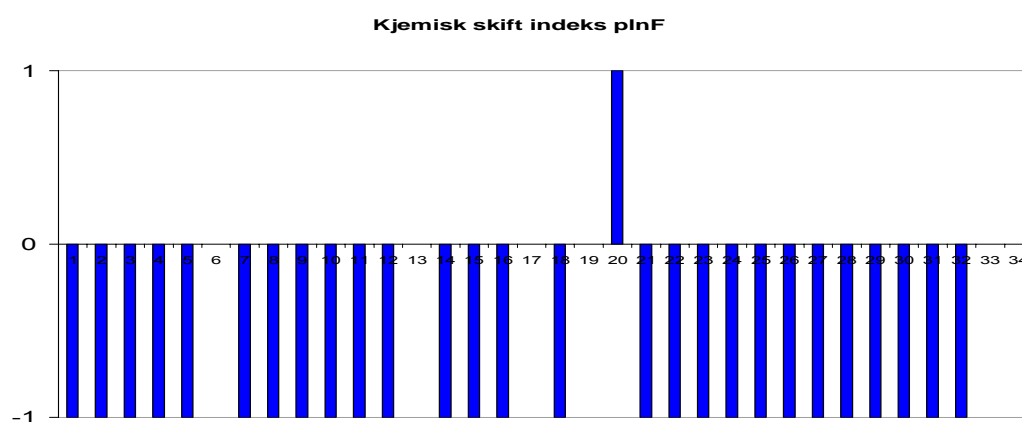
PlnE har 6 glycin og plnF har 4, og disse har som nevnt tidligere karakteristiske verdier i amidområdet, og man hadde dermed flere residuer som var lettere å peke ut i spekterne for plnE i forhold til plnF. Spektret i figur 5.3.1 viser at plnF har like mange topper i det aktuelle området, men noen av disse stammet fra sidekjedene.

Av skiftverdiene til amidprotonene ser man også utfra HSQC-spektrene at disse verdiene har en noe større spredning for plnE enn for plnF, og dette gjorde at tilordningen mellom de ulike spinnsystemene var enklere å utføre for plnE enn for plnF.

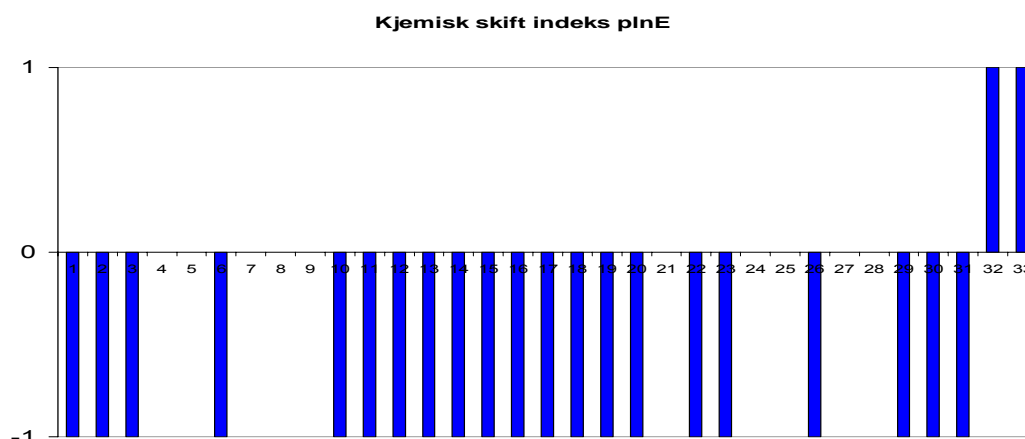
5.4 Kjemisk skift indeksing (CSI)

Når assigneringene var på plass ble det utført en såkalt kjemisk skift-indeksing (CSI, se avsnitt 3.2.9) utfra H α -skiftverdiene til de ulike residuene for både plnF og plnE. Resultatene av disse indikerer at begge peptidene har stor grad av α -heliksstruktur.

Figur 5.4.1 og 5.4.2 viser at både plnE og plnF har en lang rekke -1 og 0 -verdier som tilsier α -heliks-struktur. For plnF er det et avbrekk for prolin20 som har en avvikende verdi på +1, og plnE har de to C-terminale residuene isoleucin32 og arginin33 som eneste unntak.



Figur 5.4.1 Kjemisk skift indeks for plnF.



Figur 5.4.2 Kjemisk skift indeks (CSI) for plnE.

5.5 Resultater av strukturkalkuleringen

5.5.1 Strukturkalkulering av plnF

Avstandsbegrensingene som ble brukt i strukturkalkuleringen av plnF er illustrert i figur 5.5.1. c). Som figuren viser er typiske tilknytninger som man forventer i α -heliks funnet for store deler av plnF. I den N-terminale enden for residue 1-5 er det færre slike tilknytninger hvilket viser at peptidet er mindre strukturert i dette området.

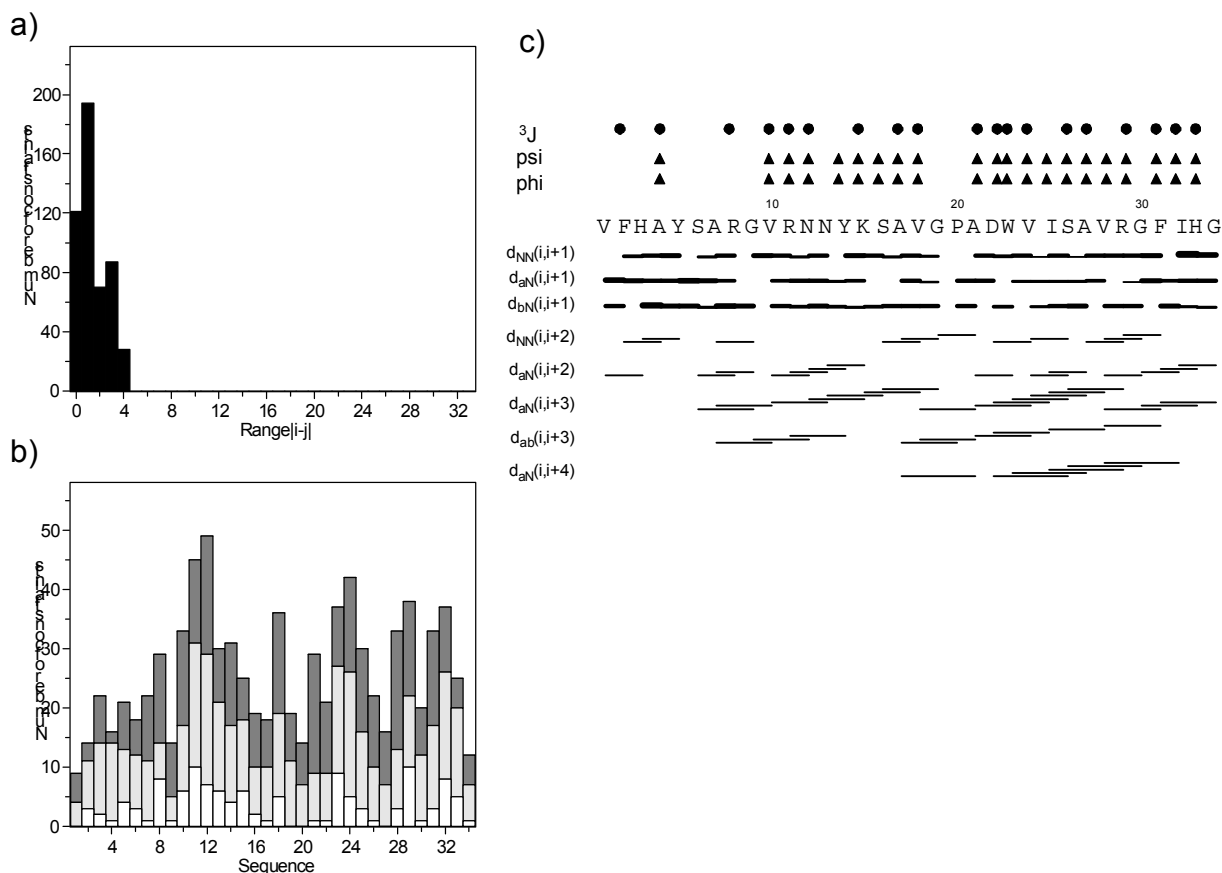
Figur 5.5.1 c) viser at for residue 6-19 så er avstandsbegrensinger av typen NN(i, i+1) tatt med i kalkuleringen for stort sett hele området. Unntakene skyldes at forventete krysstopper har befunnet seg på diagonalen av spekterne p.g.a. overlappende skiftverdier slik at det ikke har vært mulig å verken avkrefte eller bekrefte at de er der, eller at krysstoppene har vært så nær diagonalen at det ikke har vært mulig å få til en god integrering. Eksempel på dette er HN-HN (R13-H14). Dette gjelder også avstandsbegrensinger mellom NN(i, i+2), her er det sannsynlig at flere mulige krysstopper ligger på diagonalen av spektrene. Dette gjelder f.eks. for HN-HN(Y6-F8, N7-G9, S11-R13, V16-D18).

Når det gjelder mulige krysstopper av typen α N(i, i+1), α N(i, i+2) og α N(i, i+3), β N(i, i+1) så vil man forvente å finne disse i en α -heliksstruktur. Ved å gå tilbake å se på spektrene i disse

områdene fant man at flere slike avstandsbegrensinger var sannsynlige men at eventuelle kryssstopper befant seg i overlappende områder. Generelt blir overlappende topper tatt med når en bruker CANDID-rutinen hvis det er klart ut i fra intensiteten til toppene at de må komme fra mer enn en interaksjon.

I 2D-NOESY-spekteret var det også tilsvarende problemer, her kan man forvente å finne kryssstopper for $\alpha\beta(i, i+3)$. Her var det i noen tilfelle mulighet for overlapp og i andre tilfeller var det ikke mulighet for kryssstopper. Eksempler på dette er $\alpha\beta(\text{R8-R11, V10-N13, N12-K15})$ som var mulige i overlappende områder, mens $\alpha\beta(\text{A7-V10, R11-Y14, N13-S16})$ kunne utelukkes fordi det ikke var kryssstopper i det forventete området.

Tilsvarende eksempler kan man finne for området 20-34. Her kan man forøvrig se at det er funnet mange avstandsbegrensninger som er typiske for alfavheliksstrukturer, spesielt i området 22-30.



Figur 5.5.1.1 Avstandsbegrensninger som er brukt i kalkuleringen av strukturen til *plnF*. a) viser antall avstandsbegrensninger som funksjon av avstand i hovedkjeden. b) viser antall avstandsbegrensninger for de ulike residuene (1-34), der hvite søyler representerer avstander innen residuet, lys grå viser avstander til naboresiduer og mørkegrå søyler viser avstander videre opp til 5 residuer unna. Figuren i c) viser et utvalg av interresidue-krysstopper som er assignert for de ulike residuene i *plnF*. Tykkelsen på linjene står i forhold til krysstoppenes intensitet. I c) er det også markert med trekant for phi- og psi-vinklene som er beregnet i TALOS, og som tilfredsstiller α -heliksstruktur. Prikkene markerer for hvilke residuer hvor koblingskonstanten til HN-Ha er overensstemmende med α -heliksstruktur ($^3J < 6$ Hz).

I figur 5.5.1 c) er det også markert med trekant der hvor phi(ϕ)- og psi(ψ)-vinkler beregnet fra TALOS var i overensstemmelse med α -heliksstruktur.

Koblingskonstanter fra HNHA-spekter for verdier der $^3J_{\text{H}\alpha\text{HN}} < 6,0$ Hz, og som dermed også er i overensstemmelse med α -heliksstruktur er markert med prikker. Enkelte 3J -koblingskonstanter med verdier mellom 6 og 7 er brukt i beregningen, dette gjelder residue 3, 5 og 16.

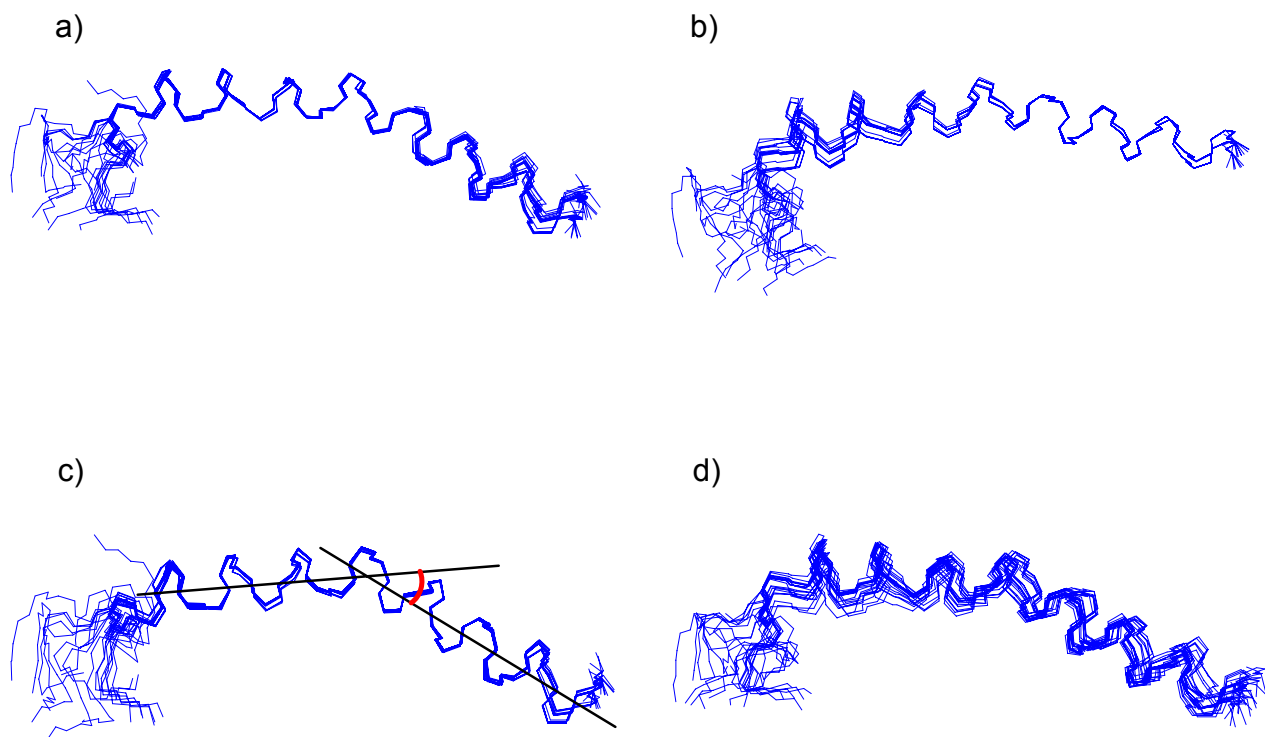
Resultater og diskusjon

I figur 5.5.1.1 a) viser antall avstandsbegrensninger som funksjon av avstand i hovedkjeden. Det er flest avstandsbegrensninger for korte avstander i hovedkjeden, spesielt begrensninger mellom naboresiduer og avstander innad i et residue. Det er også endel avstandsbegrensninger for middels avstand i kjeden - mellom residuer (i, i+2) og mellom (i, i+3). Det er færre avstandsbegrensninger av typen (i, i+4), og ingen avstandsbegrensninger for lange avstander av typen (i, i+5) eller større. Dette er også forventet i en α -heliksstruktur.

I figur 5.5.1.1 b) kan man se antall avstandsbegrensninger for hvert enkelt residue. Fargene viser om avstandene representerer korte, medium eller lange avstander i kjeden. Man kan se at antall avstander varierer mye. Dette skyldes i første rekke at antall atomer i sidekjedene vil variere. For eksempel har glycine9, glycine19 og glycine34 få avstandsbegrensninger fordi glycine inneholder få protoner. I tillegg er det noen færre avstandsbegrensninger for lengre avstander i den mer ustrukturerte N-terminale enden av peptidet.

De endelige strukturkalkuleringene ga 100 strukturer hvorav de 20 med lavest energi ble beholdt. Strukturensamblet med de 20 strukturene som tilfredstilte dataene ble undersøkt videre. I figur 5.5.1.2 er disse vist med ulike superimoseringer ved hjelp av programmet MOLMOL (Koradi *et al.* 1996). I figurene ligger den N-terminale enden til venstre. Denne enden er mer ustrukturert enn resten av peptidet som viser α -heliksstruktur. Superimosering av områdene 6-20 a), og 22-30 b) viser at de 20 strukturene har små standardavvik i disse områdene. Beregninger over standardavvik til hovedkjeden for ensamblet av 20 endelige strukturer er gitt i tabell 5.5.1.1. Tabellen viser at gjennomsnittlig standardavvik for hele strukturen har høyere verdier enn tilsvarende for områdene 6-20, 22-30 og 6-30. Dette bekrefter at det er en stor grad av strukturering i disse områdene.

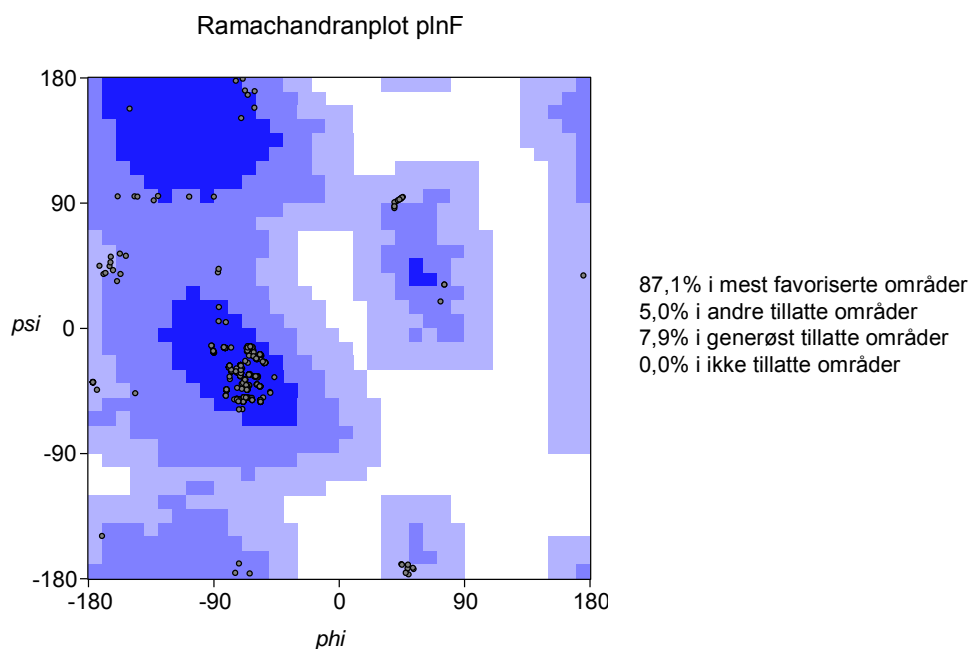
En superimosering i 5.5.1.2 c) over residuene 6-30 viser at plnF har en knekk ved proline20. Denne knekken er anslått til å ha en vinkel på 30° . Superimoseringen viser også at det er stor grad av strukturering i peptidet, med unntak av området ved den N-terminale enden fra residue 1 til residue 5/6.



Figur 5.5.1.2 Superimposeringer over det endelige strukturensemblet til plnF. I a) er det superimposert over residue 6-20. I b) er det superimposert over residue 22-30. Superimposering i c) over residue 6-30 viser en knekk ved prolin20 (ca. 30°). I d) vises superimposering over hele peptidet. Figurene er laget ved bruk av MOLMOL (Koradi et al. 1996).

Tabell 5.5.1.1 Gjennomsnittlig standardavvik for 20 endelige beregnede strukturer i ulike residue-områder til plnF.

RMSD (Global Root-Mean-Square-Difference) for plnF		
Residuer	Hovedkjede	Alle atomer
1-34	$1,93 \pm 0,83 \text{ \AA}$	$2,79 \pm 1,01 \text{ \AA}$
6-20	$0,19 \pm 0,14 \text{ \AA}$	$0,69 \pm 0,17 \text{ \AA}$
22-30	$0,11 \pm 0,11 \text{ \AA}$	$0,42 \pm 0,14 \text{ \AA}$
6-30	$0,25 \pm 0,13 \text{ \AA}$	$0,65 \pm 0,14 \text{ \AA}$



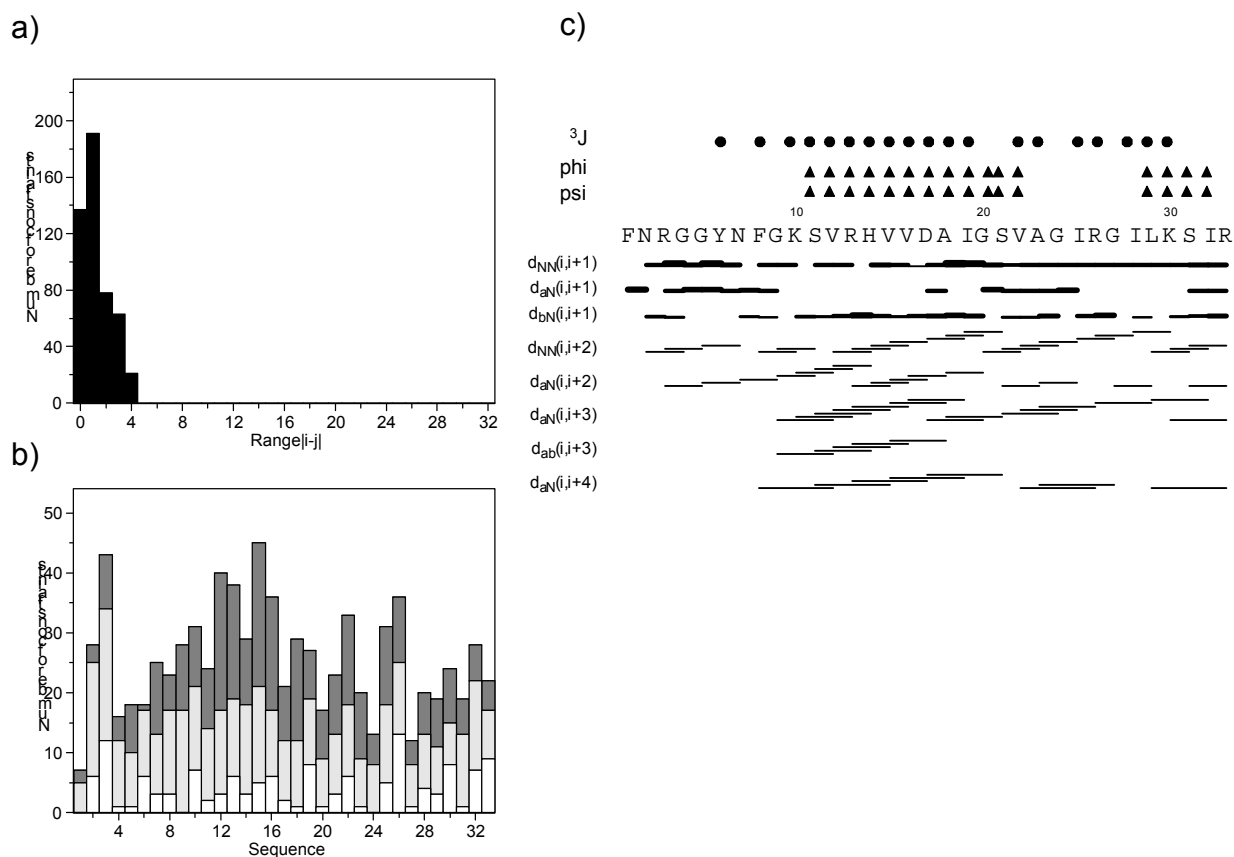
Figur 5.5.1.3 Ramachandranplot for 20 endelige beregnede strukturer av plnF. Felter som viser tillatte kombinasjoner av torsjonsvinkler er gradert i blått. De torsjonsvinkelkombinasjonene som er funnet er markert i sort. Figuren er laget ved hjelp av programmet MOLMOL (Koradi et al. 1996).

Ramachandranplot for de 20 endelige beregnete strukturene er vist i figur 5.5.1.3. Figuren viser at hovedvekten av kombinasjonene av torsjonsvinklene ϕ (phi) og ψ (psi), som referer til rotasjoner av to residueenheter rundt samme $C\alpha$ -atom, ligger i området som kjennetegner α -heliksstrukturer. Dette er i overensstemmelse med resterende data.

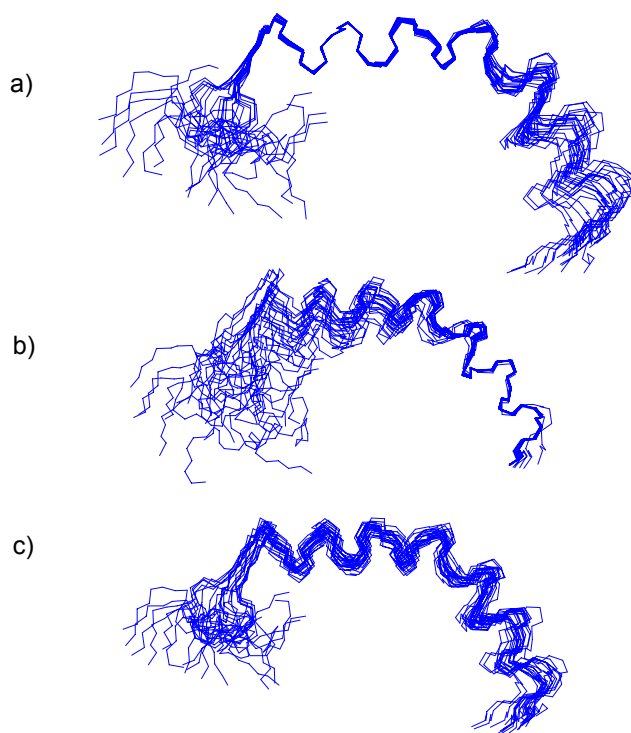
5.5.2 Strukturkalkuleringen av plnE.

I strukturkalkuleringen til plnE ble det brukt tilsvarende data som for plnF og vil derfor bli gitt en kortere omtale.

Fordelingen av avstandene som funksjon av avstand i sidekjeden i 5.5.2.1 a) viser samme mønster som for plnF. I figuren som viser antall avstandsbegrensninger for hvert enkelt residue, ser man at antall avstandsbegrensninger varierer mye også her. Glycinene (4, 5, 9, 20, 24 og 27) har færre avstandsbegrensninger, og det samme gjelder residuene i den N-terminale enden. De ulike typen tilknytninger som er funnet for de ulike residuene er gitt i figur 5.5.2.1 c), og disse viser mange typiske avstandsbegrensninger som er karakteristiske for α -helikser fra residue 10 (lysin) og videre for residuene mot C-terminal ende. Også her ser man at mange forventete avstandsbegrensninger ikke er tatt med. Spesielt gjelder dette $\alpha N(i, i+1)$ og dette skyldes mye overlapp i spektrene i disse områdene, og at avstandene kan være beregnet til å være så lange at de ikke gir strukturinformasjon. Alle disse tilknytningene var mulige ut i fra spekterne. Det samme gjelder kryssstopper for $NN(i, i+1)$.



Figur 5.5.2.1 Avstandsbegrensninger som er brukt i kalkuleringen av strukturen til *plnE*. a) viser antall avstandsbegrensninger som funksjon av avstand i hovedkjeden. b) viser antall avstandsbegrensninger for de ulike residuene (1-34), der hvite søyler representerer avstander innen residuet, lys grå viser avstander til naboresiduer og mørkegrå søyler viser avstander videre opp til 5 residuer unna. Figuren i c) viser et utvalg interresidue-krysstopper som er assignert for de ulike residuene i *plnE*. Tykkelsen på linjene står i forhold til krysstoppenes intensitet. I c) er det også markert med trekant for phi- og psi-vinklene som er beregnet i TALOS, og som tilfredsstiller α -heliksstruktur. Prikkene markerer for hvilke residuer hvor koblingskonstanten til HN-Ha er overensstemmende med α -heliksstruktur ($^3J < 6$ Hz).

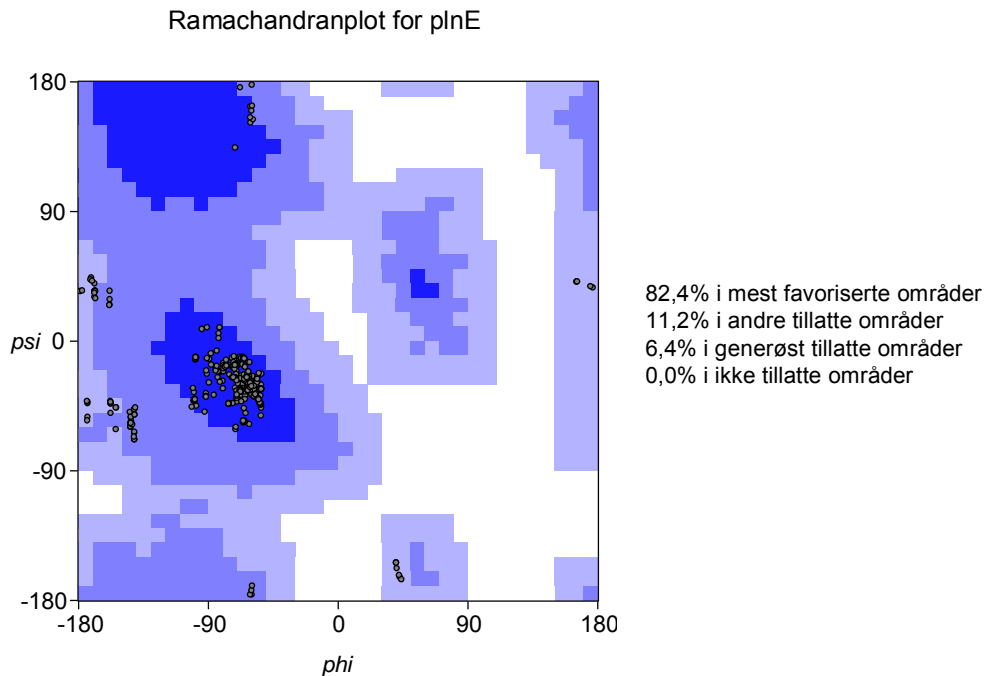


Figur 5.5.2.2 Superimposering over de 20 endelige hovedkjede-strukturene til plnE. I a) er det superimposert over residue 10-20. I b) er det superimposert over residue 25-30. Superimposering over hele peptidet (residue 1-33) vises i c). Figurene er laget ved bruk av MOLMOL (Koradi et al. 1996).

Tabell 5.5.2.1 Gjennomsnittlig standardavvik for 20 endelige beregnede strukturer i ulike residue-områder av til plnE.

RMSD (Global Root-Mean-Square-Difference) for plnE		
Residuer	Hovedkjede	Alle atomer
1-33	$2,57 \pm 0,81 \text{ \AA}$	$2,91 \pm 0,61 \text{ \AA}$
10-20	$0,20 \pm 0,11 \text{ \AA}$	$0,59 \pm 0,16 \text{ \AA}$
25-30	$0,16 \pm 0,15 \text{ \AA}$	$1,36 \pm 0,45 \text{ \AA}$

I figur 5.5.2.2 ser man ulike superimposeringer av plnE. Superimposering over området 10-20 viser stor grad av α -heliks-strukturering, det samme gjelder for området 25-30/31. I dette området har strukturensemblet et gjennomsnittlig standardavvik for hovedkjeden på mindre enn $0,30 \text{ \AA}$. Standardavviket for hele peptidet ligger på en høyere verdi fordi peptidet også inneholder ustrukturerte områder. Dette gjelder spesielt den N-terminale enden residue 1-9. Resultatene fra strukturberegningen viser også et mer fleksibelt område for residue 20-24.



Figur 5.5.2.3 Ramachandranplot for endelige strukturer av plnE. MOLMOL (Koradi et al. 1996.)

Ramachandranplottet for plnE i figur 5.5.2.3 viser at det er en overvekt av torsjonsvinkelkombinasjoner som er typiske for α -heliksstrukturer. Ingen av kombinasjonene er i ikke tillatte områder.

I den videre teksten vil det bli sett nærmere på resultatene fra strukturkalkuleringen og disse vil bli brukt som et grunnlag for en diskusjon.

5.5.3 Resultater og betraktninger om plnF

Figurene i 5.5.3.1 og 5.5.3.2 viser at plnF har amfifil karakter i de strukturerte residueområdene 6-20 og 22-30. I området 6-20 vises det at tyrosin¹⁴ ligger på den hydrofobe siden av alfaheliksen, og den kan dermed være et mulig aktivt sete i en membraninteraksjon. Det samme er tilfelle for tryptofan²³ i området 22-30. Aromatiske aminosyre-residuer som tryptofan og tyrosin er ofte involvert i peptid-/protein-membran interaksjon. Deres aromatiske egenskaper gjør dem velegnet for interaksjon med membran-interfasen som er en overgangssone mellom den hydrofobe kjernen av cellemembranen og vannet som omgir cellemembranen (Killian & von Heijne, 2000).

Molekylet har en knekk ved prolin²⁰, og figurene viser at heliksområdet ved residuene 6-20 er av en mer hydrofil karakter enn området 22-30. Det kan tenkes at det mer hydrofobe alfaheliksområdet vil kunne trenge lenger ned i membranen enn tilsvarende for det mer hydrofile området. Her vist i figur 5.5.3.3 b). Peptidet tegnet inn i tilsvarende posisjon i 5.5.3.3 a) som i 5.5.3.3 b), men her er sidekjedene tegnet inn for å gi et bilde av hvor de ulike sidekjedene kan befinne seg i forhold til membranen. Tryptofan²³ kan tenkes å befinne seg nær membranens hydrofobe kjerne, mens tyrosin¹⁴ muligens kan være lenger ut i membranens interfase.

Mutagenese hvor man erstatter henholdsvis prolin, tyrosin og tryptofan med andre aminosyrer vil kunne avgjøre om disse har en spesiell betydning for struktureringen, og/eller membran interaksjon. Tryptofan-mutagenese er med hell blitt brukt på en-peptid bakteriocinet sakacin P for å øke forståelsen av hvilke deler av peptidet som stikker dypest ned i membranen og hvordan peptidet orienterer seg i en membran (Fimland *et al.* 2002).

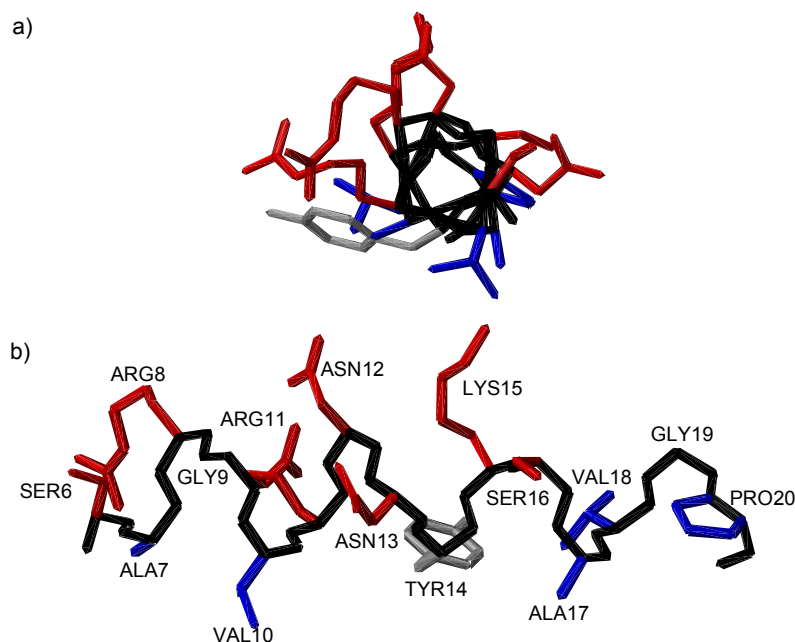
Betydningen av elektrostatiske interaksjoner mellom antimikrobielle peptider og negativt ladde fosfolipider i bakterielle cellemembraner regnes for å være vesentlig. I studiet til Hauge *et al.* 1998a er det vist at plnEF blir strukturert i nærvær av anioniske DOPG-liposomer, men lite i zwitterionske DOPG-liposomer. Disse forsøkene viser at elektrostatiske interaksjoner er viktige også for plnEF. Resultatet er ikke overraskende da plnF og plnE inneholder henholdsvis 7 og 6 positivt ladde aminosyre-residuer.

Når det gjelder orientering i forhold til membranen kan de hydrofile egenskapene og ladningen til sure og basiske aminosyreresiduer bidra til å orientere peptidene riktig i forhold til cellemembranen ved at hydrofob side av amfifil alfa heliks blir ”skjøvet” inn i membranen mens den

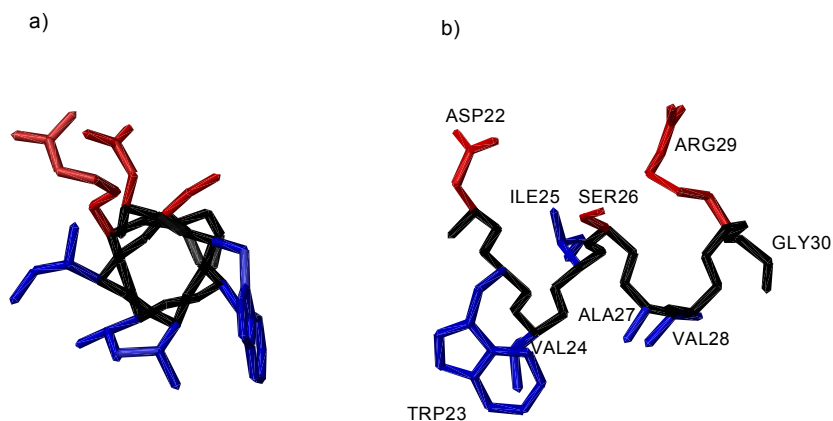
Resultater og diskusjon

hydrofile og ladde siden av alfa heliksen intragerer med vannet rundt. Av termodynamiske årsaker vil ikke det motsatte kunne skje. Det er interessant å merke seg at plnF inneholder et negativt ladet aspartat-residue ved siden av tryptofan. Dette er et mønster man finner igjen hos mange pediocin-liknende en-peptid bakteriociner, inkludert sakacin P. Ved mutagenese i sakacin P er det vist at aspartat-residuen ved siden av tryptofan ikke kan endres til hverken glutamat eller asparagin uten stort tap av aktivitet (Kazazic *et al.* 2002). Det kan virke som at tryptofan og aspartat samspiller ved at tryptofan trekker peptidet innover mot den hydrofobe delen av membranen, mens den negative ladningen på aspartat motvirker at peptidet synker for dypt fordi aspartat ikke tolererer hydrofobe interaksjoner og dermed trekker peptidet mot membranoverflaten. Dermed kan dette samspillet i membran interfasen resultere i en perfekt lokalisering av peptidet med hensyn til dypde i membranen og fenomenet er beskrevet av Killian & von Heinje 2000.

Man skal ikke utelukke at elektrostatiske interaksjoner kan være involvert i interaksjoner mellom plnE og plnF-peptidene slik at disse orienteres riktig i forhold til hverandre.

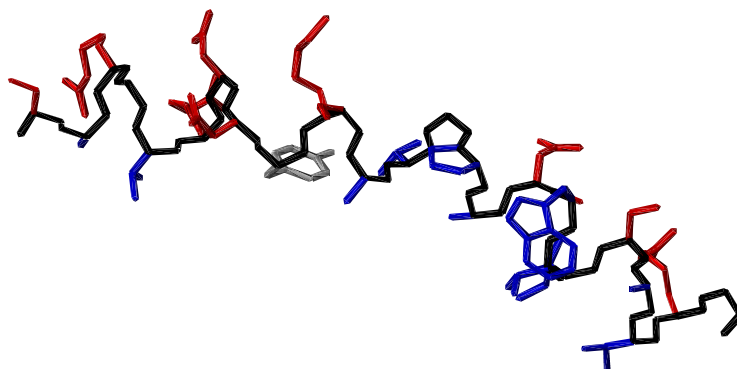


Figur 5.5.3.1 a) Viser hovedkjeden til *plnF* med sidekjeder i residueområdet 6-20. Polare sidekjeder er farget røde og upolare er farget blå. Tyrosin14 i grått. Her vist med N-terminal ende ut, b) viser samme område sett fra siden. MOLMOL (Koradi et al. 1996).

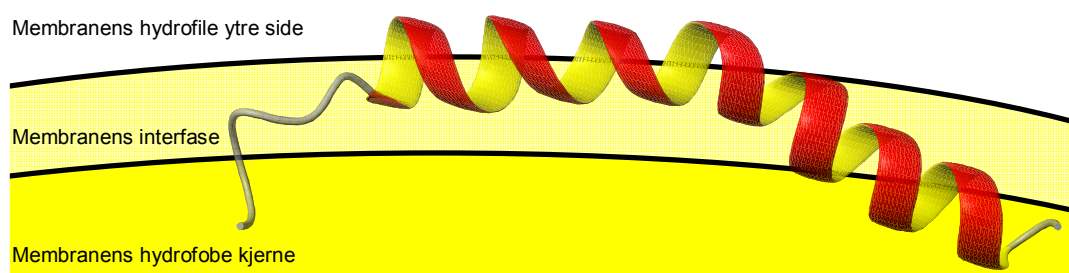


Figur 5.5.3.2 a) Hovedkjeden til *plnF* for residuer 22-30 vist med polare sidekjeder i rødt og upolare i blått. Den N-terminale enden vender ut, i b) er samme område sett fra siden. MOLMOL (Koradi et al. 1996).

a)



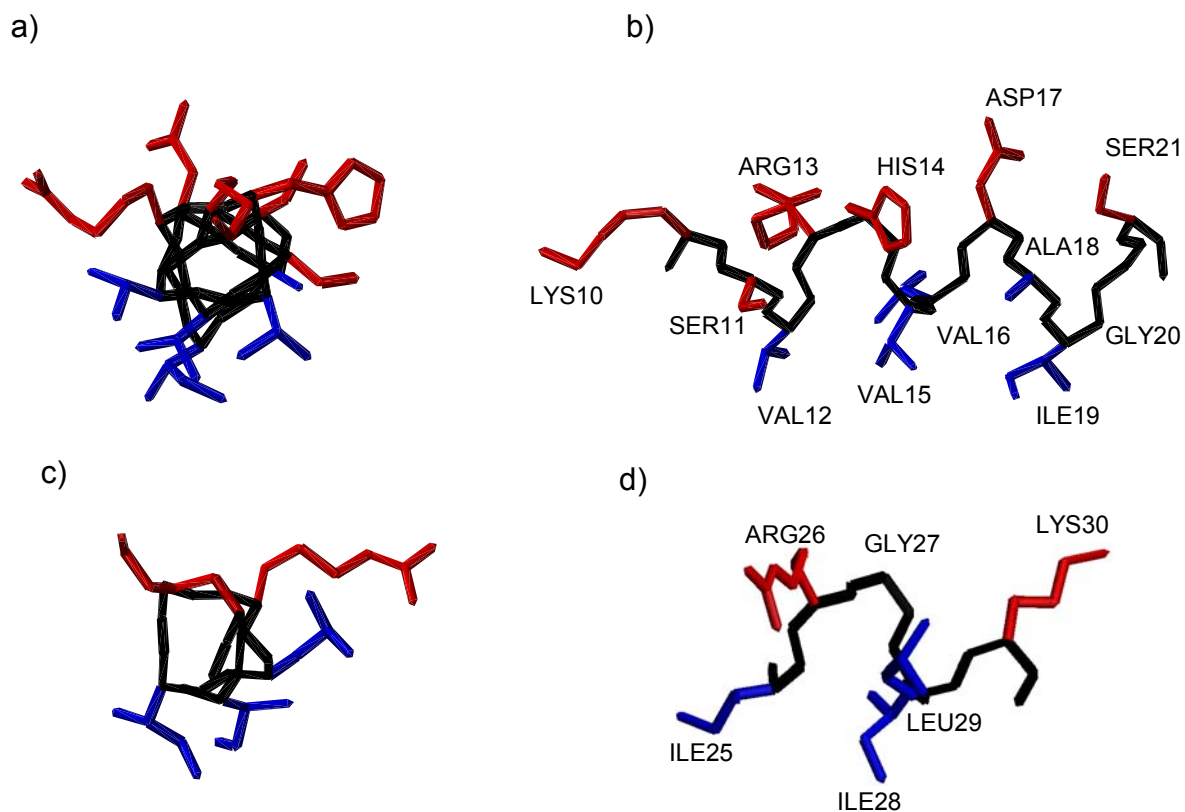
b)



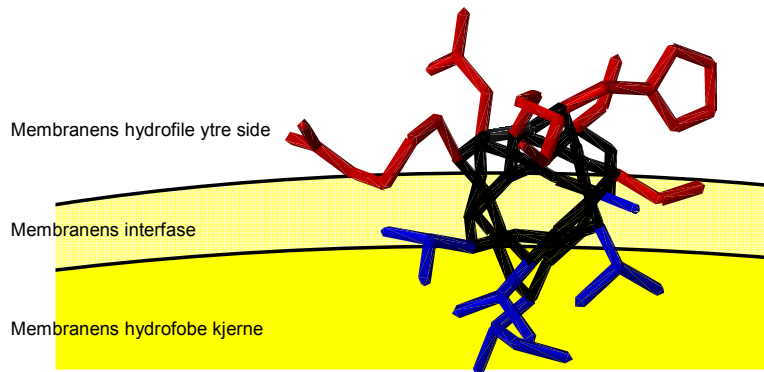
Figur 5.5.3.3 Mulig orientering av plnF i en membran i b). I a) er peptid-hovedkjeden for residue 6-30 vist i tilsvarende posisjon med polare og upolare sidekjeder tegnet i henholdsvis rødt og blått, tyrosin er tegnet i grått (Den N-terminale enden ligger til venstre). Figurene er laget ved bruk av MOLMOL (Koradi et al. 1986).

5.5.4 Resultater og betraktninger om plnE

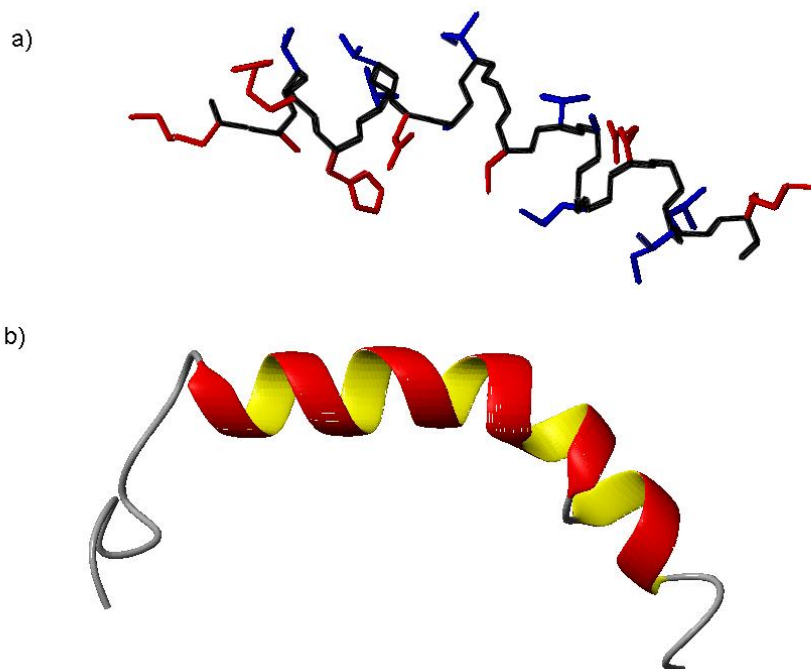
Figur 5.5.4.1 viser de to alfaheliksområdene i plnE, a) og b) viser en amfifil alfaheliks i området 10-20 ved den N-terminale enden, denne er mer polar enn heliksområdet ved den C-terminale enden vist i c) og d). Dette kan tyde en liknende membraninteraksjon for plnE som for plnF. I figur 5.5.4.2 er det vist en mulig orientering av heliksområdet 10-20 i en membran.



Figur 5.5.4.1 Figuren viser en representasjon av ulike områder av hovedkjeden til plnE. Heliksområdet fra residue 10-21 er i a) vist med den N-terminale enden ut, og fra siden i b). Heliksområdet fra 25-30 er vist med N-terminale enden ut i c) og fra siden i d). Polare residuer er tegnet i rødt og upolare residuer i blått. Figurene er laget ved bruk av MOLMOL (Koradi et al. 1986).



Figur 5.5.4.2 Mulig orientering av residue 10-21 i plnE i en membraninteraksjon.



Figur 5.5.4.3 a) viser plnE i området 10-30 med sidekjerder, hydrofile residuer er farget røde og hydrofobe er farget blå, b) viser en cartoon-presentasjon av hele plnE. De N-terminale endene ligger til venstre. Figurene er laget ved bruk av MOLMOL (Koradi et al.1986).

I plnE er det et område ved residue 22-24 (val-ala-gly) som viser mindre strukturering, og det er mulig det er en viss fleksibilitet i dette området. Det kan tenkes at dette vil kunne ha en betydning for hvordan peptidet vil interagere med en membran. I våre beregnete strukturer ser det ut til at de to amfifile heliksene i peptidet ikke har de hydrofobe sidene orientert samme vei i forhold til hverandre, men da området imellom er mer ustrukturert er det vanskelig å trekke konklusjoner ut i fra dette. Men interaksjonen med en membran og med plnF vil avhenge av orienteringen til heliksområdene.

Det kan også tenkes at plnE finnes i konformasjoner hvor det bare er delvis strukturert.

I det fleksible området av plnE er det et GXXXG-motiv (Gly20-Ser21-Val22-Ala23-Gly24). Dette er et motiv en også finner i Enterocin 1071 og Lactococin G som er to *to*-peptidbakteriociner. Disse peptidene er nylig analysert ved sete-dirigert mutagenese av Oppegård *et al.* 2007. Resultatene her tyder på at GXXXG-motivet i Enterocin 1071 og Lactococin G kan være involvert i en spesifikk interaksjon mellom peptidene i *to*-peptid-bakteriocinet. Lactococin G er også nylig strukturbestemt ved bruk av NMR (Per Rogne, upublisert data).

PlnE inneholder to GXXXG-motiver og plnF inneholder ett, og det ville vært interessant å se om samme typen analyser av plnEF ville gitt et liknende resultat.

5.5.5 Oppsummering og diskusjon

CD-datene viser at plnE og plnF er ustrukturerte i vann og at de viser økende grad av alfavheliksstruktur i et membranliknende miljø av DPC-miceller. Begge peptidene blir mindre strukturert ved økende temperatur, men kan anses som rimelig varmestabile. CD-dataene og tidligere undersøkelser antyder at struktureringen av plnF er mer avhengig av betingelser som pH/ionestyrke, temperatur og DPC-konsentrasjon. Dette kan undersøkes ved å gjøre flere CD-studier under ulike betingelser.

CD-dataene viser en større prosentandel alfavheliks i plnF-løsninger enn tilsvarende for plnE-løsninger, men dette kan skyldes ulike forhold mellom peptid i løsning og peptid strukturert i membranen.

CD-datene viser generelt lavere α -heliksinnehold enn NMR-resultatene. CD- og NMR-data samsvarer dårligst for plnE.

De to peptidene har tilsvarende lengde (33 og 34 residuer), de har ingen sekvenslikheter men NMR-resultatene viser liknende strukturer i DPC-miceller. Resultatene viser at begge har mye alfaheliksstruktur, der alfaheliksen ved den N-terminale enden er mer polar enn alfaheliksen ved den C-terminale enden. Begge peptidene er også mest ustrukturerte ved den N-terminale enden.

I plnF viser våre resultater at de to alfaheliksområdene har en knekk ved prolin20, mens for plnE er de to alfaheliksområdene avbrutt av et mer fleksibelt område rundt 21-24.

Alfaheliksområdene er amfifile, hvilket antas være av avgjørende betydning for membraninteraksjon. Plantaracin F har de aromatiske gruppene tryptofan og tyrosin på den hydrofobe siden av peptidet og disse kan tenkes å være aktive seter i en spesifikk membraninteraksjon.

Det er flere undersøkelser som kan klargjøre hvilke muligheter det er for interaksjoner. Analyse ved sete-dirigert mutagenese er allerede nevnt i avsnitt 5.5.3.

Det ville også være interessant å utføre et NMR-studie der plnE og plnF opptrer sammen i løsning, for å se om struktureringen endres i forhold til når de opptrer alene. Tidligere undersøkelser gjort av Hauge *et al.* 1998a har vist at plnE og plnF viser økt biologisk aktivitet når de opptrer sammen, CD-studier viser likevel ingen økt strukturering av disse i DPC-miceller i forhold til når de opptrer alene, mens dette blir observert i liposomer (vesicler) (Hauge *et al.* 1998). Det kan antas at dette skyldes størrelsen til micellene og at DPC ikke ville egne seg som membranliknende miljø slike undersøkelser.

Det er ellers viktig å være klar over at DPC-miceller ikke er identiske med cellemembraner, og at struktureringen kan være annerledes under naturlige forhold. Dette gjelder også i forhold til ionestyrke/pH osv. Det er vist eksempler på at peptider med amfifile α -helikser kan få endret sin biologiske aktivitet ved tilstedeværelse av miceller (Mellor *et al.* 1990), og et membranliknende miljø som biceller, som er produsert av fosfolipider kan tenkes å være et godt alternativ. Fast-fase NMR ved bruk av biceller kan gi oss informasjon om hvordan peptidene er orientert i en membran, og ville også gitt oss informasjon om virkningsmekanismen til to-peptidet.

6 Referanser

1. Atkins, P. W. (1990) Physical chemistry, fourth edition. Oxford University Press.
2. Bax, A., Davis, D. G. (1985) MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* 65, 355-360.
3. Billeter, M., Braun, W., og Wütrich, K. (1982). *J. Mol. Biol.*, 155, 321.
4. Branden, C., Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*. 1991, 1999. Second Edition. Garland.
5. Casaus, P., Nilsen T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernandez, P. E., Holo, H. (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143, 2287-2294.
6. Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., Rance, M., Skelton, N. J. (2007) *Protein NMR Spectroscopy. Principles and practice*. 2nd ed. Academic Press.
7. Claridge, T. D. W. (1999) *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Tetraedron Organic Chemistry Series Volume 19. Elsevier.
8. Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR* 13, 289-302.
9. Davis, A. L., Keeler, J., Laue, E. D., Moskau, D. (1992) Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *Journal of Magnetic Resonance* 98, 207-216.
10. Deleage, G., Clerk, F. F., Roux, B., Gautheron, D. C. (1988) ANTHEPROT: A package for protein sequence analysis using a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* 3, 351-356.
11. Dzung, B.D., Håvarstein, L.S., Nes, I.F. (1996) Characterization of the Locus Responsible for the Bacteriocin Production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178, 4472-4483.
12. Epand, R. M., and Vogel, H. J., 1999, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462, 11-28.
13. Fimland, G. (2002) Structure-function analysis of the pediocinlike bacteriocins and the immunity proteins conferring resistance to these bacteriocins. Thesis for the degree of doctor scientarum. Faculty of Mathematics and Natural Sciences University of Oslo.
14. Fimland, G, Eijsink, V. G. H., Nissen-Meyer, J. (2002) Mutational analysis of the role of tryptophan residues in an antimicrobial peptide. *Biochemistry* 41, 9508-9515.

15. Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B. Nissen-Meyer, J. (2005) Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: Biosynthesis, structure and mode of action. *J. Pep. Sci.* 11, 688-696.
16. Forsythe, G. E., Malcolm, M. A., Moler, C. B. (1977) *Computer methods for mathematical computations*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J.
17. Fregau-Gallagher, N. L., Sailer, M., Niemczura, W. P., Nakashima, T. T., Stiles, M. E., Vederas, J. C. (1997) Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 36, 15062-15072.
18. Goddard, T. D., Kneller, D. G. Sparky 3. University of California. San Fransisco.
19. Güntert, P. (1997) Calculating protein structures form NMR data. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 60: Protein NMR Techniques. Ed. Reid, D. G. Humana Press Inc. Totowa, N. J.
20. Güntert, P. (2004) Automated NMR Structure Calculation with CYANA. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 278: Protein NMR Techniques.
21. Güntert, P., Braun, W., Wütrich, K (1991) Efficient computation og three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA, and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* 217, 517-530.
22. Güntert, P., Mumenthaler, C., Wütrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol Biol.* 273, 283-298.
23. Güntert, P., Qian, Y. Q., Otting, G., Müller, M., Gehring, W., Wütrich, K. (1991). Structure determination of the Antp(G39----S) homeodomain from nuclear magnetic resonance in solution using a novel strategy for the structure calculation with the programs DIANA, CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J. Mol. Biol.* 217, 531-540.
24. Hancock R. E. W. (2001) Cationic Peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* 1, 156-164.
25. Hauge, H. H., Mantzilas, D., Eijsink, V., Nissen-Meyer, J., (1998a) Membrane-mimicking entities induce structuring of the two-peptide bacteriocins plantaricin E/F and plantaricin J/K. *J. Bacteriol.* 181, 740-747.

26. Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Eijssink, V. (1998) Amphiphilic α -helices are important structural motifs in the α and β peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G: Enhancement of helix formation upon α - β interaction. *Eur. J. Biochem.* 251, 565-572.
27. Haugen, H. S. (2005) The three-dimensional NMR-structure of the membrane-permeabilizing pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A in lipid micelles. Thesis for master degree. Thesis submitted for the degree of Candidata Scientarum. Department of Molecular Biosciences. University of Oslo.
28. Haugen H. S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., Kristiansen, P. E. (2005) Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide curvacin A. *Biochemistry* 44, 16149-16157.
29. Herrmann T., Güntert P., Wütrich K. (2002) Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* 319, 209-227.
30. Hwang, T. L., Shaka, A. J. (1995) Watersuppression that works. Excitation sculpting, using arbitrary waveforms and pulsed field gradient. *J. Magn. Reson. A* 112, 275-279.
31. Jee, J. G., Güntert, P. (2003) Influence of the completeness of chemical shift assignments on NMR structures obtained with automated NOE assignment. *J. Struct. Funct. Genomics* 4, 179-189.
32. Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer J. (2005) The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J Biol Chem.* 280, 9243-9250.
33. Johnson, W. C., Jr. (1999) Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins: Structure, functions and genetics.* 35, 307 – 312.
34. Karplus, M. (1963) Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2870-2871.
35. Kay, L. Keifer, P., Saarinen, T. (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10663-10665.

36. Kazazic, M., Nissen-Meyer, J., Fimland, G. (2002) Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology*. 148, 2019-2027.
37. Killian, J. A., von Heijne, G. (2000) How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem Sci*. 25, 429-434.
38. Kolade, O.O., Carr, S. B., Kuhlmann, U.C., Pommer, A., Kleanthous, C., Bouchcinsky, C. A., Hemmings, A. M. (2002) Structural aspects of the inhibition of DNase and rRNase colicins by their immunity proteins. *Biochimie*. 84, 439-46
39. Koradi, R., Billeter, M., Wütrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures *J Mol Graph*. 14, 51-5, 29-32.
40. Kristiansen, P. E., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J. (2005) Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaracin A. *J. Biol. Chem*. 280, 22945-22950.
41. Kristiansen, P. E. 2006. Biomolecular nuclear magnetic resonance spectroscopy. How and for what can nuclear magnetic resonance be used in biomolecular science. IMBV, UIO
42. Mellor, I. R., Sansom, M. S. P. (1990) Ion-properties of mastorpan, a 14-residue peptide form wasp venom, and of MP3, a 12-residue analogue. *Proc. R. Soc. Lond*. 239, 383-400.
43. Moll G., van der Akker, H.E., Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Konnings, W.N., Driessen, A.J.M. (1999) Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins EF and JK. *J Bacteriol*. 181, 4848-4852.
44. Nes, I., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J. (2002) Unmodified Peptide-Bacteriocins (Class II) Produced by Lactic Acid Bacteria. *Peptide antibiotics: Discovery, Modes of action and application*. pp. 81-115. Eds: C. J. Dutton, M.A. Haxell, H. A. I. McArthur and R. G. Wax. Marcel Dekker, New York.
45. Nieto-Lozano, J. C., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Pelaz, C., Nes I. F. (1992) Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol* 138, 1985-1990.
46. Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis, and their mechanism of action. *Arch. Microbiol*. 167, 67-77.

47. Oppegård, C., Fimland, G., Thorbæk, L., Nissen-Meyer, J. (2007) Analysis of the two-peptide bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2931-2938.
48. Palmer III, A. G., Cavanagh, J., Wright, P. E., Rance, M. (1991) Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR-spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 93, 151-170.
49. Provencher, S. W., Glöckner, J. (1981) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33 – 37.
50. Redfield, C. (1993) NMR of macromolecules. A practical approach. Ed. Roberts, G. C. K.
51. Reid, D. G, MacLachlan, L. K., Edwards, A. J., Hubbard, J. A., Sweeney, P. (1997) Introduction to the NMR of proteins. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 60: Protein NMR Techniques. Ed. Reid, D. G. Humana Press. Totowa, NJ.
52. Scheucher, J., Scwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzy, O., Glaser, S. J., Sorensen, O. W., Griesinger, C. (1994) A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol NMR* 4, 301-306.
53. Sheehan, D. *Physical Biochemistry. Principles and applications.* (2002) Wiley.
54. Scholtz, J. M., Hong, Q., York, E. J., Stewart, J. M., Baldwin, R. L. (1991) *Biopolymers* 31, 1463-1470.
55. Seavey, B. R., Farr, E. A, Westler, W. M., Markley, J. L. (1991) A relational database for sequence-specific protein NMR-data. *J. Biomol. NMR*, 1, 217-236.
56. Shenkarev, Z. O., Balashova, T. A., Efremov, R. G., Yakimenko, Z. A., Ovchinnikova, T. V., Raap, J., Arseniev, A. S. (2002) Spatial structure of zervamicin IIB bound to DPC micelles: implications for voltage-gating. *Biophys. J.* 82, 762-771.
57. Sreerama, N., Woody, R. W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 209, 32- 44.
58. Sreerama, N., Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287, 252-260.
59. Sreerama, N., Woody, R. W. (2004) On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci.* 13, 100-112.

60. Stafford, R. E., Fanni, T., Dennis, E. A. (1989) Interfacial properties and critical micelle concentration of lysophospholipids. *Biochemistry* 28, 5113-5120.
61. Stiles, M. E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70, 331-345.
62. Uteng, M., Hauge, H., Markwich, P., Fimland, G., Mantzilas, D. Nissen-Meyer, J., Muhle-Goll, C. (2003) Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42, 11417-11426.
63. Uteng, M. (2002) Elucidation of the three-dimensional structure of an antimicrobial peptide, SakP(N24C + 44C), in a membrane-mimicking environment by the use of NMR spectroscopy. Thesis submitted for the degree of Candidata Scientarum. Department of Biochemistry. University of Oslo.
64. van Holde, K. E., Curtis Johnson, W., Shing Ho, P. (2006) *Principles of Physical Biochemistry*. Pearson.
65. Vuister, G. W., Bax, A. (1993) Quantitative J Correlation: A new approach for measuring homonuclear three-bond $J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$ coupling constants in ^{15}N -enriched proteins.
66. Vuister, G. W., Bax, A. (1994) Measurement of four-bond $\text{H}(\text{N})\text{-H}\alpha$ J-couplings in staphylococcal nuclease. *J. of Biomol NMR* 4, 193-200.
67. Williams, D. H., Fleming, I. (1989) *Spectroscopic methods in organic chemistry*. Fourth edition.
68. Williamson, M. P., Asakura, T. (1997) Protein chemical shifts. *Methods in Molecular Biology*, Vol 60: Protein NMR techniques. Ed. Reid, D. G. Humana Press Inc., Totowa, N. J.
69. Wang Y., Henz, M. E., Gallagher N. L., Chai, S., Gibbs, A. C., Stiles, M. E., Wishart, D. S., Vederas, J. C. (1999) Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*. 38, 15438-15447.
70. Williamson, M. P. (1990) Secondary-structure dependent chemical shifts in proteins. *Biopolymers* 29, 1423-1431.
71. Wishart, D. S., Sykes, B. D., Richards, F. M. (1992) The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* 31, 1647-1651.

72. Whiles, J. A, Deems, R., Vold, R. R., Dennis, E. A. (2002) Bicelles in structure-function studies of membrane-associated proteins. *Bioorg. Chem.* 30, 431-442.
73. Wütrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*. Wiley. New York.
74. Wütrich, K., Wider, G., Wagner, G., Braun, W. (1982) Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* 155, 311-319.
75. Zhang, J., Lazaridis, T. (2006) Calculating the free energy of association of transmembrane helices. *Biophys. J.* 91, 1710-1723.

Vedlegg 1

Forkortelser som er brukt i oppgaven

CANDID	Combined automated NOE assignment and structure determination module
CD-spektroskopi	Circular dichroism-spektroskopi
CYANA	Combined assignment and dYnamics Algorithm for NMR Applications
DSS	2,2-dimetyl-2-silapentan-5-sulfonat
DPC	dodecylphosphocholine
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect spectroscopy
TFA	Trifluoracetic acid
TFE	Trifluorethanol
TOCSY	Total correlation spectroscopy

Vedlegg 2: Protonskiftlister for plnE og plnF

Protonskiftliste for plnE

Residue	δNH	δH_α	δH_β	δH_γ	δH_δ	δandre
Phe 1		4,237			7,227	
Asn 2	8,715	4,738	2,767; 2,627		7,610; 6,903	
Arg 3	8,522	4,200	1,857; 1,777	1,630	3,165	7,399
Gly 4	8,474	3,833				
Gly 5	8,161	3,814				
Tyr 6	8,023	4,316	2,743; 2,647		6,953	6,736
Asn 7	8,511	4,711	2,831; 2,655		7,695; 6,938	
Phe 8	8,566	4,389	3,105		7,259	
Gly 9	8,882	3,979; 3,641				
Lys 10	8,004	3,948	1,759	1,432; 1,302	1,655	3,102
Ser 11	7,999	4,292	3,991; 3,861			
Val 12	8,185	3,506	2,064	0,838		
Arg 13	8,066	3,784	1,842	1,588	3,108	7,441
His 14	8,002	4,396	3,408		7,213	
Val 15	7,885	3,592	2,243	1,091; 0,921		
Val 16	8,324	3,487	2,110	0,992; 0,915		
Asp 17	8,362	4,395	2,890			
Ala 18	7,825	4,161	1,433			
Ile 19	7,942	3,845	1,959	1,131; 0,896	0,795	
Gly 20	8,102	3,872				
Ser 21	7,780	4,515	3,971; 4,052			
Val 22	8,239	3,870	2,200	1,057; 0,964		
Ala 23	8,574	4,092	1,408			
Gly 24	8,425	3,905; 3,997				
Ile 25	7,919	3,884	2,023	1,206; 0,932	0,873	
Arg 26	8,481	3,886	1,868; 1,764	1,571	3,188	7,440
Gly 27	8,106	3,834; 3,910				
Ile 28	7,688	3,874	1,999	1,213; 0,869		
Leu 29	8,125	4,003	1,863		0,893; 0,831	
Lys 30	7,893	4,005	1,889	1,514	1,646	2,934; 7,609
Ser 31	7,661	4,369	3,924; 4,008			
Ile 32	7,408	4,119	1,948	1,265; 0,915	0,835	
Arg 33	7,830	4,231	1,824	1,684	3,176	7,472

Protonskift-liste for plnF

Residue	δNH	δH_α	δH_β	δH_γ	δH_δ	δandre
Val 1		3,700	2,034	0,833		
Phe 2	8,877	4,474	3,016; 2,978		7,162	
His 3	8,407	4,442	2,977; 2,875		7,167	7,162
Ala 4	8,112	4,021	1,208			
Tyr 5	7,770	4,481	2,890		7,000	6,699
Ser 6	8,092	4,491	3,780; 3,948			
Ala 7	8,786	4,110	1,395			
Arg8	8,323	3,987	1,751	1,585		7,264
Gly 9	8,294	3,854				
Val 10	8,008	3,820	2,142	0,990; 0,894		
Arg 11	8,265	3,974	1,864; 1,777	1,576	3,118	7,509
Asn 12	8,197	4,580	2,720		7,618; 6,853	
Asn 13	7,947	4,798	2,616		7,690; 7,038	
Tyr 14	7,971	4,278	3,157; 2,904		7,030	6,732
Lys 15	7,864	3,843	1,732	1,172	1,606	7,613; 2,903
Ser 16	8,024	4,274	3,896			
Ala 17	7,985	4,275	1,420			
Val18	7,439	3,588	2,030	1,015; 0,907		
Gly19	8,448	3,886				
Pro 20		4,561	2,228	1,911	3,599	
Ala 21	8,172	3,987	1,419			
Asp 22	8,748	4,423	2,880			
Trp 23	8,320	4,181	3,295; 3,121		7,294	10,534; 7,429; 6,799; 6,985
Val 24	8,212	3,275	2,273	1,095; 0,849		
Ile 25	8,354	3,449	1,850	0,854		
Ser 26	7,964	4,023	3,859			
Ala 27	7,994	3,872	0,920			
Val 28	8,328	3,565	2,119	0,966; 0,869		
Arg 29	8,454	3,799	1,835	1,560	3,093	7,461
Gly 30	7,987	3,794				
Phe 31	7,813	4,408	3,155		7,198	7,194
Ile 32	7,898	3,702	1,813	1,199; 0,747		
His 33	7,996	4,572	3,155; 3,298		7,218	7,197
Gly 34	7,913	3,891				

VEDLEGG 3: Avstandsbegrensninger for plnE og plnF**Avstandsbegrensninger, plnE**

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
1 PHE	HA	2 ASN	HN	2.92
1 PHE	HA	2 ASN	QD2	5.31
1 PHE	QD	2 ASN	HB2	5.50
1 PHE	QD	2 ASN	HB3	5.50
1 PHE	QD	2 ASN	HN	3.86
1 PHE	QD	3 ARG	HN	3.99
1 PHE	QD	4 GLY	HN	4.64
2 ASN	HB2	3 ARG	HN	4.05
2 ASN	HB3	3 ARG	HN	4.05
2 ASN	HN	2 ASN	HB2	3.87
2 ASN	HN	2 ASN	HB3	3.87
2 ASN	HN	2 ASN	HD21	5.50
2 ASN	HN	2 ASN	HD22	5.50
2 ASN	HN	2 ASN	QB	3.15
2 ASN	HN	3 ARG	HN	3.63
2 ASN	HN	3 ARG	QB	5.22
2 ASN	HN	3 ARG	QD	3.90
2 ASN	HN	3 ARG	QG	5.10
2 ASN	HN	4 GLY	HN	5.15
2 ASN	HN	5 GLY	HN	5.50
2 ASN	QB	2 ASN	QD2	3.27
2 ASN	QB	3 ARG	HN	3.18
2 ASN	QB	4 GLY	HN	4.60
2 ASN	QD2	3 ARG	HA	5.31
2 ASN	QD2	3 ARG	HB2	5.50
2 ASN	QD2	3 ARG	HB3	5.50
2 ASN	QD2	3 ARG	HN	4.88
2 ASN	QD2	3 ARG	QB	4.81
2 ASN	QD2	3 ARG	QD	4.58
2 ASN	QD2	3 ARG	QG	5.39
3 ARG	HA	3 ARG	HE	4.33
3 ARG	HA	3 ARG	QD	4.98
3 ARG	HA	3 ARG	QG	4.29
3 ARG	HA	4 GLY	HN	3.65
3 ARG	HA	5 GLY	HN	4.31
3 ARG	HB2	4 GLY	HN	4.44
3 ARG	HB3	4 GLY	HN	4.44
3 ARG	HN	3 ARG	HB2	3.76
3 ARG	HN	3 ARG	HB3	3.76
3 ARG	HN	3 ARG	HE	4.18
3 ARG	HN	3 ARG	QB	3.09

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
3 ARG	HN	3 ARG	QD	3.74
3 ARG	HN	3 ARG	QG	3.26
3 ARG	HN	4 GLY	HN	2.80
3 ARG	HN	4 GLY	QA	4.50
3 ARG	HN	5 GLY	HN	4.67
3 ARG	QB	3 ARG	HE	2.87
3 ARG	QB	4 GLY	HN	3.75
3 ARG	QB	5 GLY	HN	3.59
3 ARG	QB	7 ASN	HN	4.99
3 ARG	QB	7 ASN	QD2	4.50
3 ARG	QD	4 GLY	HN	4.46
3 ARG	QG	3 ARG	HE	3.53
3 ARG	QG	3 ARG	QD	2.94
3 ARG	QG	4 GLY	HN	4.22
3 ARG	QG	5 GLY	HN	4.80
3 ARG	QG	7 ASN	HN	4.99
3 ARG	QG	7 ASN	QD2	5.34
4 GLY	HN	4 GLY	QA	2.62
4 GLY	HN	5 GLY	HN	3.32
4 GLY	HN	5 GLY	QA	5.16
4 GLY	HN	6 TYR	QD	5.39
4 GLY	QA	5 GLY	HN	3.02
5 GLY	HN	5 GLY	QA	2.71
5 GLY	HN	6 TYR	HA	4.91
5 GLY	HN	6 TYR	HN	2.84
5 GLY	HN	6 TYR	QB	4.75
5 GLY	HN	6 TYR	QD	4.56
5 GLY	HN	6 TYR	QE	5.01
5 GLY	HN	7 ASN	HN	3.24
5 GLY	HN	7 ASN	QB	4.39
5 GLY	QA	6 TYR	HN	3.03
5 GLY	QA	7 ASN	HN	4.71
6 TYR	HA	6 TYR	QD	3.92
6 TYR	HA	7 ASN	HN	3.61
6 TYR	HN	6 TYR	HB2	3.76
6 TYR	HN	6 TYR	HB3	3.76
6 TYR	HN	6 TYR	QB	2.95
6 TYR	HN	6 TYR	QD	3.34
6 TYR	HN	6 TYR	QE	4.25
6 TYR	HN	7 ASN	HA	4.51
6 TYR	HN	7 ASN	HN	3.35
6 TYR	QD	7 ASN	HN	3.65
6 TYR	QE	7 ASN	HN	5.40
7 ASN	HA	8 PHE	HN	3.24
7 ASN	HA	9 GLY	HN	4.84

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
7 ASN	HB2	8 PHE	HN	4.01
7 ASN	HB2	9 GLY	HN	5.16
7 ASN	HB3	8 PHE	HN	4.01
7 ASN	HB3	9 GLY	HN	5.16
7 ASN	HN	7 ASN	QB	3.01
7 ASN	HN	7 ASN	QD2	4.23
7 ASN	HN	10 LYS	QE	4.67
7 ASN	QB	7 ASN	QD2	3.18
7 ASN	QB	8 PHE	HA	4.81
7 ASN	QB	9 GLY	HN	4.47
7 ASN	QD2	8 PHE	HN	4.67
8 PHE	HA	8 PHE	QD	4.34
8 PHE	HA	9 GLY	HA2	4.89
8 PHE	HA	9 GLY	HN	3.62
8 PHE	HA	12 VAL	HN	4.57
8 PHE	HN	8 PHE	QB	3.51
8 PHE	HN	8 PHE	QD	3.58
8 PHE	HN	9 GLY	HA1	4.48
8 PHE	HN	9 GLY	HA2	4.48
8 PHE	HN	9 GLY	HN	3.58
8 PHE	HN	9 GLY	QA	3.73
8 PHE	HN	10 LYS	HN	3.64
8 PHE	HN	10 LYS	QB	5.50
8 PHE	HN	10 LYS	QE	5.50
8 PHE	HN	11 SER	HN	4.35
8 PHE	HN	12 VAL	QQG	4.78
8 PHE	QB	9 GLY	HA2	4.85
8 PHE	QB	9 GLY	HN	4.56
8 PHE	QD	9 GLY	HN	4.02
9 GLY	HA2	10 LYS	HG2	5.21
9 GLY	HA2	10 LYS	HG3	5.21
9 GLY	HA2	10 LYS	QG	4.25
9 GLY	HA2	12 VAL	HB	4.39
9 GLY	HN	10 LYS	HN	3.55
9 GLY	HN	10 LYS	QB	4.54
9 GLY	HN	10 LYS	QD	3.70
9 GLY	HN	10 LYS	QE	4.85
9 GLY	HN	10 LYS	QG	5.12
9 GLY	HN	11 SER	HN	3.96
9 GLY	HN	12 VAL	HB	4.95
9 GLY	HN	12 VAL	HN	4.76
9 GLY	HN	12 VAL	QQG	3.97
9 GLY	QA	11 SER	HN	4.41
9 GLY	QA	12 VAL	HN	3.96
10 LYS	HA	12 VAL	HN	5.50

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
10 LYS	HA	13 ARG	HN	3.80
10 LYS	HG2	11 SER	HN	4.78
10 LYS	HG3	11 SER	HN	4.48
10 LYS	HN	10 LYS	HA	2.90
10 LYS	HN	10 LYS	HG2	4.11
10 LYS	HN	10 LYS	HG3	4.11
10 LYS	HN	10 LYS	QB	3.02
10 LYS	HN	10 LYS	QD	3.43
10 LYS	HN	10 LYS	QE	4.06
10 LYS	HN	10 LYS	QG	3.58
10 LYS	HN	12 VAL	HB	5.50
10 LYS	HN	12 VAL	QQG	4.99
10 LYS	QB	11 SER	HN	3.79
10 LYS	QD	11 SER	HN	3.56
10 LYS	QE	11 SER	HN	4.03
10 LYS	QG	11 SER	HN	3.97
10 LYS	QG	12 VAL	HN	5.16
10 LYS	QG	13 ARG	HN	5.34
11 SER	HA	13 ARG	HN	4.12
11 SER	HA	14 HIS	HD2	5.50
11 SER	HA	14 HIS	HN	3.24
11 SER	HA	14 HIS	QB	4.87
11 SER	HA	15 VAL	HN	4.36
11 SER	HB2	12 VAL	HN	4.15
11 SER	HB3	12 VAL	HN	4.15
11 SER	HN	11 SER	HB2	3.21
11 SER	HN	11 SER	HB3	3.21
11 SER	HN	12 VAL	HB	4.63
11 SER	HN	12 VAL	HN	3.41
11 SER	QB	12 VAL	HN	3.43
11 SER	QB	12 VAL	QQG	4.56
11 SER	QB	13 ARG	HN	5.07
11 SER	QB	15 VAL	HN	5.34
12 VAL	HA	12 VAL	QQG	4.09
12 VAL	HA	14 HIS	HN	4.31
12 VAL	HA	15 VAL	HB	3.89
12 VAL	HA	15 VAL	HN	3.62
12 VAL	HA	15 VAL	QQG	3.87
12 VAL	HB	13 ARG	HE	5.50
12 VAL	HB	13 ARG	HN	3.57
12 VAL	HN	12 VAL	HB	3.36
12 VAL	HN	12 VAL	QQG	2.93
12 VAL	HN	13 ARG	HA	5.50
12 VAL	HN	13 ARG	HN	3.64
12 VAL	HN	13 ARG	QD	4.62

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
12 VAL	HN	13 ARG	QG	4.35
12 VAL	HN	14 HIS	HN	4.18
12 VAL	HN	14 HIS	QB	5.28
12 VAL	HN	15 VAL	HB	5.33
12 VAL	HN	15 VAL	HN	4.77
12 VAL	HN	15 VAL	QG1	4.74
12 VAL	HN	16 VAL	QG2	5.38
12 VAL	QQG	13 ARG	HA	4.67
12 VAL	QQG	13 ARG	HN	3.40
12 VAL	QQG	15 VAL	HN	4.37
12 VAL	QQG	16 VAL	HN	3.80
13 ARG	HA	13 ARG	HE	3.50
13 ARG	HA	15 VAL	HN	4.55
13 ARG	HA	16 VAL	HB	4.32
13 ARG	HA	16 VAL	HN	3.93
13 ARG	HA	16 VAL	QG1	4.55
13 ARG	HA	16 VAL	QG2	4.55
13 ARG	HA	16 VAL	QQG	3.86
13 ARG	HA	17 ASP	HN	4.57
13 ARG	HE	16 VAL	QG2	3.90
13 ARG	HN	13 ARG	HE	4.85
13 ARG	HN	13 ARG	QB	2.68
13 ARG	HN	13 ARG	QD	4.10
13 ARG	HN	13 ARG	QG	3.64
13 ARG	HN	14 HIS	HA	5.10
13 ARG	HN	14 HIS	QB	4.66
13 ARG	HN	15 VAL	HB	5.50
13 ARG	HN	15 VAL	HN	4.31
13 ARG	HN	15 VAL	QG1	5.29
13 ARG	HN	16 VAL	HN	4.77
13 ARG	HN	16 VAL	QG2	4.20
13 ARG	QB	13 ARG	HE	3.05
13 ARG	QB	14 HIS	HN	2.91
13 ARG	QB	15 VAL	HN	4.84
13 ARG	QB	16 VAL	HN	4.91
13 ARG	QD	14 HIS	HN	4.74
13 ARG	QG	14 HIS	HN	4.44
14 HIS	HA	14 HIS	HD2	4.62
14 HIS	HA	16 VAL	HN	4.51
14 HIS	HD2	15 VAL	HA	5.50
14 HIS	HD2	15 VAL	HN	4.88
14 HIS	HD2	15 VAL	QG1	5.50
14 HIS	HD2	15 VAL	QG2	5.50
14 HIS	HD2	15 VAL	QQG	4.81
14 HIS	HD2	18 ALA	QB	5.50

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
14 HIS	HE1	18 ALA	QB	5.50
14 HIS	HN	14 HIS	HD2	4.18
14 HIS	HN	14 HIS	QB	2.97
14 HIS	HN	15 VAL	HB	4.38
14 HIS	HN	15 VAL	HN	3.22
14 HIS	HN	15 VAL	QG1	4.36
14 HIS	HN	16 VAL	HN	3.96
14 HIS	QB	15 VAL	HN	3.41
14 HIS	QB	15 VAL	QQG	4.85
14 HIS	QB	17 ASP	HN	5.19
15 VAL	HA	15 VAL	QG1	4.08
15 VAL	HA	15 VAL	QG2	4.08
15 VAL	HA	17 ASP	HN	4.43
15 VAL	HA	18 ALA	HA	5.50
15 VAL	HA	18 ALA	QB	4.31
15 VAL	HA	18 ALA	HN	3.95
15 VAL	HA	19 ILE	HN	4.75
15 VAL	HB	16 VAL	HN	3.91
15 VAL	HN	15 VAL	HB	3.36
15 VAL	HN	15 VAL	QG1	3.12
15 VAL	HN	15 VAL	QG2	3.64
15 VAL	HN	16 VAL	HB	4.42
15 VAL	HN	16 VAL	HN	3.52
15 VAL	HN	16 VAL	QG2	4.51
15 VAL	HN	17 ASP	HN	5.50
15 VAL	HN	18 ALA	QB	4.63
15 VAL	QG1	16 VAL	HN	3.58
15 VAL	QG1	17 ASP	HN	4.44
15 VAL	QG1	18 ALA	HN	4.31
15 VAL	QG2	16 VAL	HN	4.80
15 VAL	QG2	18 ALA	HN	4.13
16 VAL	HA	16 VAL	QG1	3.79
16 VAL	HA	16 VAL	QG2	3.79
16 VAL	HA	16 VAL	QQG	3.12
16 VAL	HA	18 ALA	HN	4.15
16 VAL	HA	18 ALA	QB	5.50
16 VAL	HA	19 ILE	HN	4.09
16 VAL	HA	19 ILE	QD1	3.87
16 VAL	HB	17 ASP	HN	3.50
16 VAL	HB	18 ALA	HN	4.92
16 VAL	HN	16 VAL	HB	3.35
16 VAL	HN	16 VAL	QG1	3.65
16 VAL	HN	16 VAL	QG2	3.18
16 VAL	HN	17 ASP	HN	5.50
16 VAL	HN	17 ASP	QB	4.56

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
16 VAL	HN	18 ALA	QB	4.70
16 VAL	QG1	17 ASP	HN	3.21
16 VAL	QG2	17 ASP	HN	4.23
17 ASP	HA	18 ALA	HN	3.57
17 ASP	HA	20 GLY	HN	4.06
17 ASP	HA	21 SER	HN	4.71
17 ASP	HN	17 ASP	QB	3.07
17 ASP	HN	17 ASP	QB	3.94
17 ASP	HN	18 ALA	HA	5.21
17 ASP	HN	18 ALA	HN	3.39
17 ASP	HN	18 ALA	QB	4.21
17 ASP	HN	19 ILE	HN	4.49
17 ASP	HN	20 GLY	HN	5.36
17 ASP	QB	18 ALA	HN	3.33
18 ALA	HA	20 GLY	HN	4.06
18 ALA	HA	21 SER	HN	4.34
18 ALA	HN	18 ALA	QB	2.97
18 ALA	HN	19 ILE	HB	4.99
18 ALA	HN	19 ILE	HN	2.70
18 ALA	HN	19 ILE	QD1	4.08
18 ALA	HN	19 ILE	QG1	4.90
18 ALA	HN	20 GLY	HN	4.24
18 ALA	QB	19 ILE	HA	4.80
18 ALA	QB	19 ILE	HN	3.05
18 ALA	QB	20 GLY	HN	4.48
18 ALA	QB	21 SER	HN	4.17
19 ILE	HA	19 ILE	QD1	4.51
19 ILE	HA	19 ILE	QG1	3.90
19 ILE	HA	19 ILE	QG2	3.28
19 ILE	HA	22 VAL	QG1	5.50
19 ILE	HB	19 ILE	QD1	3.70
19 ILE	HB	20 GLY	HN	3.32
19 ILE	HB	21 SER	HN	5.07
19 ILE	HN	19 ILE	HA	2.91
19 ILE	HN	19 ILE	HB	2.81
19 ILE	HN	19 ILE	QD1	3.05
19 ILE	HN	19 ILE	QG1	3.45
19 ILE	HN	20 GLY	HN	2.74
19 ILE	HN	21 SER	HN	4.10
19 ILE	HN	22 VAL	HN	5.21
19 ILE	QD1	20 GLY	HN	4.53
19 ILE	QG1	20 GLY	HN	4.67
19 ILE	QG2	20 GLY	HN	3.86
20 GLY	HN	20 GLY	QA	2.62
20 GLY	HN	21 SER	HA	4.75

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
20 GLY	HN	21 SER	HN	3.27
20 GLY	HN	22 VAL	HB	5.50
20 GLY	HN	22 VAL	HN	5.08
20 GLY	HN	22 VAL	QQG	4.17
20 GLY	QA	21 SER	HN	3.07
21 SER	HA	22 VAL	HN	3.62
21 SER	HA	23 ALA	HN	4.20
21 SER	HA	24 GLY	HN	5.19
21 SER	HB2	22 VAL	HN	4.65
21 SER	HB3	22 VAL	HN	4.65
21 SER	HN	21 SER	HB2	3.78
21 SER	HN	21 SER	HB3	3.78
21 SER	HN	21 SER	QB	3.12
21 SER	HN	22 VAL	HB	4.89
21 SER	HN	22 VAL	HN	3.71
21 SER	HN	22 VAL	QQG	3.70
21 SER	HN	23 ALA	HN	4.71
21 SER	HN	24 GLY	HN	5.21
21 SER	HN	25 ILE	QD1	4.79
21 SER	QB	22 VAL	HN	3.70
22 VAL	HA	22 VAL	QG1	3.72
22 VAL	HA	22 VAL	QG2	3.68
22 VAL	HA	23 ALA	HN	3.55
22 VAL	HA	25 ILE	HN	4.39
22 VAL	HA	26 ARG	HN	4.19
22 VAL	HB	23 ALA	HN	4.15
22 VAL	HB	24 GLY	HN	5.50
22 VAL	HB	25 ILE	HN	5.50
22 VAL	HB	26 ARG	HN	5.33
22 VAL	HN	22 VAL	HB	3.46
22 VAL	HN	22 VAL	QG1	3.92
22 VAL	HN	22 VAL	QG2	3.92
22 VAL	HN	22 VAL	QQG	3.11
22 VAL	HN	23 ALA	HN	3.64
22 VAL	HN	23 ALA	QB	4.50
22 VAL	HN	24 GLY	HN	4.38
22 VAL	HN	25 ILE	HB	5.06
22 VAL	HN	25 ILE	QD1	4.66
22 VAL	QG1	23 ALA	HA	5.24
22 VAL	QQG	25 ILE	HN	4.96
22 VAL	QQG	26 ARG	HN	4.75
23 ALA	HA	24 GLY	HN	3.46
23 ALA	HA	25 ILE	HN	4.16
23 ALA	HA	26 ARG	HN	4.36
23 ALA	HA	27 GLY	HN	5.24

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
23 ALA	HN	23 ALA	QB	3.03
23 ALA	HN	24 GLY	HN	3.48
23 ALA	HN	25 ILE	HB	5.16
23 ALA	HN	25 ILE	HN	4.04
23 ALA	HN	25 ILE	QD1	4.91
23 ALA	HN	26 ARG	QB	5.32
23 ALA	QB	24 GLY	HN	3.34
23 ALA	QB	25 ILE	HN	4.64
23 ALA	QB	26 ARG	HN	5.36
24 GLY	HN	25 ILE	HB	4.13
24 GLY	HN	25 ILE	HN	3.59
24 GLY	HN	25 ILE	QD1	4.21
24 GLY	HN	25 ILE	QG1	4.71
24 GLY	HN	26 ARG	QB	5.08
24 GLY	QA	25 ILE	HN	3.14
25 ILE	HB	25 ILE	QD1	3.61
25 ILE	HB	26 ARG	HN	3.46
25 ILE	HN	25 ILE	HB	3.31
25 ILE	HN	25 ILE	QD1	3.74
25 ILE	HN	25 ILE	QG1	3.85
25 ILE	HN	25 ILE	QG2	3.74
25 ILE	HN	26 ARG	HB2	4.76
25 ILE	HN	26 ARG	HB3	4.76
25 ILE	HN	26 ARG	HN	3.54
25 ILE	HN	26 ARG	QB	3.91
25 ILE	HN	26 ARG	QD	5.50
25 ILE	HN	27 GLY	HN	4.19
25 ILE	HN	28 ILE	HN	4.65
25 ILE	QG1	26 ARG	HN	4.77
25 ILE	QG2	26 ARG	HN	3.53
26 ARG	HA	26 ARG	QD	3.94
26 ARG	HA	26 ARG	QG	3.36
26 ARG	HA	29 LEU	HN	3.32
26 ARG	HB2	26 ARG	QD	3.40
26 ARG	HB3	26 ARG	QD	3.40
26 ARG	HN	26 ARG	HB2	3.36
26 ARG	HN	26 ARG	HB3	3.36
26 ARG	HN	26 ARG	QB	2.83
26 ARG	HN	26 ARG	QD	4.13
26 ARG	HN	26 ARG	QD	5.50
26 ARG	HN	26 ARG	QG	4.12
26 ARG	HN	27 GLY	HN	3.51
26 ARG	HN	28 ILE	HN	4.09
26 ARG	HN	28 ILE	QG1	5.20
26 ARG	HN	29 LEU	HN	4.91

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
26 ARG	QB	26 ARG	QD	2.88
26 ARG	QB	27 GLY	HN	3.05
26 ARG	QD	26 ARG	HE	2.74
26 ARG	QD	27 GLY	HN	4.79
26 ARG	QG	26 ARG	HE	3.07
26 ARG	QG	27 GLY	HN	4.51
27 GLY	HN	27 GLY	QA	2.43
27 GLY	HN	28 ILE	HN	3.44
27 GLY	HN	28 ILE	QG1	4.50
27 GLY	HN	28 ILE	QG2	3.77
27 GLY	HN	30 LYS	HN	5.28
27 GLY	QA	29 LEU	HN	4.15
28 ILE	HA	28 ILE	QG1	3.48
28 ILE	HB	29 LEU	HN	4.44
28 ILE	HB	31 SER	HN	5.04
28 ILE	HN	28 ILE	HB	3.63
28 ILE	HN	28 ILE	QG1	3.50
28 ILE	HN	28 ILE	QG2	2.97
28 ILE	HN	29 LEU	HA	4.85
28 ILE	HN	29 LEU	HN	3.47
28 ILE	HN	29 LEU	QB	4.03
28 ILE	HN	30 LYS	HN	4.94
28 ILE	HN	30 LYS	QG	4.60
28 ILE	QG1	29 LEU	HN	3.97
28 ILE	QG1	30 LYS	HN	4.98
28 ILE	QG2	29 LEU	HN	4.26
29 LEU	HA	29 LEU	QQD	2.93
29 LEU	HA	32 ILE	HN	3.43
29 LEU	HA	33 ARG	HN	3.97
29 LEU	HN	29 LEU	QB	2.90
29 LEU	HN	29 LEU	QQD	3.05
29 LEU	HN	30 LYS	HN	3.44
29 LEU	HN	30 LYS	QG	4.07
29 LEU	HN	31 SER	HN	4.02
29 LEU	HN	32 ILE	HN	4.84
29 LEU	QQD	31 SER	HN	5.13
30 LYS	HA	30 LYS	QD	3.68
30 LYS	HA	30 LYS	QG	3.54
30 LYS	HA	32 ILE	QG1	4.92
30 LYS	HA	33 ARG	HN	4.14
30 LYS	HN	30 LYS	QB	2.71
30 LYS	HN	30 LYS	QD	3.94
30 LYS	HN	30 LYS	QE	4.73
30 LYS	HN	30 LYS	QG	3.17
30 LYS	HN	31 SER	HA	5.08

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
30 LYS	HN	31 SER	HN	3.38
30 LYS	HN	32 ILE	HN	4.26
30 LYS	QB	30 LYS	QE	4.93
30 LYS	QB	31 SER	HN	3.92
30 LYS	QB	32 ILE	HN	5.13
30 LYS	QD	30 LYS	QZ	4.10
30 LYS	QD	31 SER	HN	3.73
30 LYS	QG	31 SER	HN	3.70
30 LYS	QG	32 ILE	HN	4.76
31 SER	HA	32 ILE	HN	3.61
31 SER	HA	33 ARG	HN	4.85
31 SER	HN	31 SER	QB	3.03
31 SER	HN	32 ILE	HA	4.95
31 SER	HN	32 ILE	HN	3.23
31 SER	HN	32 ILE	QD1	5.50
31 SER	HN	32 ILE	QG1	4.32
31 SER	HN	32 ILE	QG2	5.50
31 SER	HN	33 ARG	HA	5.50
31 SER	HN	33 ARG	HN	4.17
31 SER	QB	32 ILE	HN	3.70
32 ILE	HA	32 ILE	QD1	4.13
32 ILE	HA	32 ILE	QG2	4.01
32 ILE	HA	33 ARG	HN	3.63
32 ILE	HA	33 ARG	QG	5.03
32 ILE	HB	32 ILE	QD1	3.68
32 ILE	HB	33 ARG	HN	3.27
32 ILE	HN	32 ILE	HB	3.11
32 ILE	HN	32 ILE	QD1	3.60
32 ILE	HN	32 ILE	QG1	3.38
32 ILE	HN	32 ILE	QG2	3.79
32 ILE	HN	33 ARG	HA	4.14
32 ILE	HN	33 ARG	HN	3.20
32 ILE	HN	33 ARG	QB	4.52
32 ILE	QG1	33 ARG	HN	4.35
32 ILE	QG2	33 ARG	HN	3.88
33 ARG	HA	33 ARG	QD	4.33
33 ARG	HB2	33 ARG	HE	4.73
33 ARG	HB3	33 ARG	HE	4.73
33 ARG	HN	33 ARG	HE	5.23
33 ARG	HN	33 ARG	QB	3.20
33 ARG	HN	33 ARG	QD	4.78
33 ARG	HN	33 ARG	QG	3.48
33 ARG	QB	33 ARG	HE	4.15
33 ARG	QG	33 ARG	HE	3.00

Avstandsbegrensninger, plnF

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
1 VAL	HA	2 PHE	HN	3.07
1 VAL	HA	2 PHE	QB	5.10
1 VAL	HA	3 HIS	HN	4.77
1 VAL	HB	2 PHE	HN	3.52
1 VAL	HB	3 HIS	HN	3.82
1 VAL	QQG	2 PHE	HN	3.44
1 VAL	QQG	3 HIS	HN	3.77
1 VAL	QQG	4 ALA	HN	4.35
1 VAL	QQG	5 TYR	HN	4.59
2 PHE	HA	2 PHE	QD	3.81
2 PHE	HA	3 HIS	HN	3.29
2 PHE	HA	3 HIS	HN	3.50
2 PHE	HN	2 PHE	QB	3.21
2 PHE	HN	2 PHE	QD	3.83
2 PHE	HN	3 HIS	HN	3.76
2 PHE	HN	3 HIS	QB	4.61
2 PHE	HN	4 ALA	HN	5.14
2 PHE	HN	5 TYR	HN	4.77
2 PHE	HN	5 TYR	QD	5.20
2 PHE	QD	3 HIS	HN	5.19
3 HIS	HA	4 ALA	HN	3.50
3 HIS	HA	4 ALA	QB	5.50
3 HIS	HA	5 TYR	QD	5.11
3 HIS	HD2	4 ALA	HN	4.27
3 HIS	HD2	4 ALA	QB	5.50
3 HIS	HD2	5 TYR	HN	5.04
3 HIS	HN	3 HIS	HD2	5.43
3 HIS	HN	3 HIS	QB	3.11
3 HIS	HN	4 ALA	HA	4.59
3 HIS	HN	4 ALA	HN	3.47
3 HIS	HN	4 ALA	QB	4.07
3 HIS	HN	5 TYR	HN	4.67
3 HIS	HN	5 TYR	QD	3.92
3 HIS	HN	5 TYR	QE	5.18
3 HIS	QB	4 ALA	HN	2.96
4 ALA	HA	5 TYR	HN	3.63
4 ALA	HN	4 ALA	QB	2.92
4 ALA	HN	5 TYR	HN	3.26
4 ALA	HN	5 TYR	QD	4.24
4 ALA	HN	5 TYR	QE	5.50
4 ALA	QB	5 TYR	HN	3.26
5 TYR	HA	5 TYR	QD	3.95
5 TYR	HA	6 SER	HN	3.13

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
5 TYR	HN	5 TYR	QB	3.13
5 TYR	HN	5 TYR	QD	3.40
5 TYR	HN	5 TYR	QE	4.71
5 TYR	QB	6 SER	HN	3.32
5 TYR	QD	6 SER	HN	3.78
5 TYR	QE	6 SER	HN	5.50
6 SER	HA	7 ALA	HN	3.29
6 SER	HA	8 ARG	HE	5.50
6 SER	HA	8 ARG	HN	3.48
6 SER	HA	9 GLY	HN	4.13
6 SER	HA	9 GLY	HN	4.67
6 SER	HB2	7 ALA	HN	4.62
6 SER	HB3	7 ALA	HN	4.62
6 SER	HB3	10 VAL	HN	4.50
6 SER	HN	6 SER	HB2	3.95
6 SER	HN	6 SER	HB3	3.95
6 SER	HN	6 SER	QB	3.34
6 SER	HN	7 ALA	HN	4.22
6 SER	QB	7 ALA	HN	3.92
6 SER	QB	8 ARG	HE	5.34
6 SER	QB	8 ARG	HN	3.66
7 ALA	HA	8 ARG	HN	3.70
7 ALA	HA	9 GLY	HN	3.74
7 ALA	HA	10 VAL	HB	4.39
7 ALA	HA	10 VAL	HN	3.73
7 ALA	HA	10 VAL	HN	3.90
7 ALA	HA	10 VAL	QG1	3.74
7 ALA	HN	7 ALA	QB	3.17
7 ALA	HN	8 ARG	HN	3.53
7 ALA	HN	8 ARG	QB	4.45
7 ALA	HN	9 GLY	HN	4.94
7 ALA	HN	10 VAL	HN	5.43
7 ALA	HN	10 VAL	QG1	5.50
7 ALA	QB	8 ARG	HE	5.13
7 ALA	QB	8 ARG	HN	3.16
7 ALA	QB	9 GLY	HN	4.40
7 ALA	QB	10 VAL	HN	4.28
7 ALA	QB	11 ARG	HE	5.50
7 ALA	QB	11 ARG	HN	4.40
8 ARG	HA	8 ARG	HE	4.25
8 ARG	HA	8 ARG	QB	3.05
8 ARG	HA	8 ARG	QG	3.23
8 ARG	HA	11 ARG	HE	4.78
8 ARG	HA	11 ARG	QD	3.80
8 ARG	HA	11 ARG	QG	3.30

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
8 ARG	HA	12 ASN	HD22	4.68
8 ARG	HE	11 ARG	QD	2.81
8 ARG	HE	11 ARG	QD	3.52
8 ARG	HE	12 ASN	HD21	5.50
8 ARG	HN	8 ARG	HE	3.97
8 ARG	HN	8 ARG	QB	2.84
8 ARG	HN	8 ARG	QG	4.04
8 ARG	HN	11 ARG	QD	4.18
8 ARG	QB	8 ARG	HE	3.43
8 ARG	QB	9 GLY	HN	3.23
8 ARG	QB	12 ASN	HD21	4.36
8 ARG	QB	12 ASN	HD22	4.89
8 ARG	QG	8 ARG	HE	3.40
8 ARG	QG	12 ASN	HD21	4.62
8 ARG	QG	12 ASN	HD22	4.37
9 GLY	HN	9 GLY	QA	2.68
9 GLY	HN	10 VAL	HB	4.53
9 GLY	HN	10 VAL	HN	3.31
9 GLY	HN	10 VAL	QG1	4.69
9 GLY	HN	11 ARG	QD	5.27
9 GLY	QA	12 ASN	QB	4.81
9 GLY	QA	12 ASN	HD21	4.64
9 GLY	QA	12 ASN	HD22	4.80
9 GLY	QA	12 ASN	QB	4.90
10 VAL	HA	10 VAL	QG1	3.35
10 VAL	HA	10 VAL	QG2	3.05
10 VAL	HA	11 ARG	HN	3.70
10 VAL	HA	12 ASN	QB	5.23
10 VAL	HA	13 ASN	HN	4.09
10 VAL	HA	13 ASN	QD2	4.17
10 VAL	HB	11 ARG	HN	3.51
10 VAL	HB	12 ASN	HN	5.50
10 VAL	HN	10 VAL	HA	2.92
10 VAL	HN	10 VAL	HB	3.04
10 VAL	HN	10 VAL	QG1	3.05
10 VAL	HN	10 VAL	QG2	3.68
10 VAL	HN	11 ARG	HN	3.57
10 VAL	HN	11 ARG	QG	4.05
10 VAL	QG1	11 ARG	HA	3.75
10 VAL	QG1	11 ARG	HB2	5.14
10 VAL	QG1	11 ARG	HB3	3.90
10 VAL	QG1	11 ARG	HN	3.44
10 VAL	QG1	12 ASN	HN	4.38
10 VAL	QG1	13 ASN	HN	4.98
10 VAL	QG2	12 ASN	HN	5.50

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
10 VAL	QG2	13 ASN	HN	5.05
11 ARG	HA	12 ASN	HD21	5.42
11 ARG	HA	12 ASN	HN	3.63
11 ARG	HA	13 ASN	HN	3.67
11 ARG	HA	13 ASN	HN	4.72
11 ARG	HA	14 TYR	QD	4.70
11 ARG	HA	14 TYR	HB3	4.79
11 ARG	HB2	12 ASN	HN	3.95
11 ARG	HB2	14 TYR	HB3	4.82
11 ARG	HB3	11 ARG	QD	3.02
11 ARG	HB3	12 ASN	HN	3.95
11 ARG	HN	11 ARG	HB2	3.64
11 ARG	HN	11 ARG	HB3	3.64
11 ARG	HN	11 ARG	HE	5.06
11 ARG	HN	11 ARG	QB	3.16
11 ARG	HN	11 ARG	QD	3.76
11 ARG	HN	11 ARG	QG	3.71
11 ARG	HN	12 ASN	HA	5.35
11 ARG	HN	12 ASN	HD21	5.50
11 ARG	HN	12 ASN	HN	4.36
11 ARG	HN	12 ASN	QB	4.41
11 ARG	HN	14 TYR	QD	4.93
11 ARG	QB	11 ARG	HE	5.34
11 ARG	QB	12 ASN	HN	3.43
11 ARG	QB	13 ASN	HN	5.30
11 ARG	QD	11 ARG	HE	2.87
11 ARG	QD	12 ASN	HD21	4.79
11 ARG	QD	12 ASN	HD22	5.50
11 ARG	QD	12 ASN	HN	4.66
11 ARG	QG	11 ARG	HE	3.55
11 ARG	QG	12 ASN	HN	4.11
12 ASN	HA	12 ASN	HD21	4.23
12 ASN	HA	12 ASN	HD22	4.28
12 ASN	HA	13 ASN	HN	3.50
12 ASN	HA	14 TYR	HN	4.52
12 ASN	HA	15 LYS	HN	4.29
12 ASN	HA	15 LYS	HN	4.89
12 ASN	HN	12 ASN	HD21	4.17
12 ASN	HN	12 ASN	HD22	4.41
12 ASN	HN	12 ASN	QB	3.10
12 ASN	HN	13 ASN	HA	5.44
12 ASN	HN	13 ASN	HD21	5.50
12 ASN	HN	13 ASN	HD22	5.50
12 ASN	HN	13 ASN	HN	3.47
12 ASN	HN	14 TYR	QD	5.50

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
12 ASN	QB	12 ASN	HD21	3.37
12 ASN	QB	12 ASN	HD22	3.52
12 ASN	QB	13 ASN	HD21	4.16
12 ASN	QB	13 ASN	HD22	4.16
12 ASN	QB	13 ASN	HN	3.20
12 ASN	QB	13 ASN	HN	4.50
12 ASN	QB	13 ASN	QD2	3.53
12 ASN	QB	14 TYR	HN	4.51
12 ASN	QB	15 LYS	HN	5.18
12 ASN	QB	15 LYS	HN	5.42
13 ASN	HA	14 TYR	HN	4.00
13 ASN	HA	15 LYS	HN	5.02
13 ASN	HA	16 SER	HN	4.88
13 ASN	HN	13 ASN	HD21	4.14
13 ASN	HN	13 ASN	HD22	4.14
13 ASN	HN	13 ASN	QB	3.36
13 ASN	HN	13 ASN	QD2	3.61
13 ASN	HN	14 TYR	HA	5.04
13 ASN	HN	14 TYR	HB2	5.50
13 ASN	HN	14 TYR	HB3	4.22
13 ASN	QB	13 ASN	HD21	4.01
13 ASN	QB	13 ASN	HD22	4.01
13 ASN	QB	14 TYR	HN	3.85
13 ASN	QB	15 LYS	HN	5.32
13 ASN	QB	15 LYS	HN	5.36
13 ASN	QD2	14 TYR	HN	5.21
14 TYR	HA	14 TYR	QD	3.69
14 TYR	HA	15 LYS	HN	3.70
14 TYR	HA	18 VAL	QG2	4.50
14 TYR	HB2	15 LYS	HN	4.09
14 TYR	HB2	16 SER	HN	5.30
14 TYR	HB3	15 LYS	HN	4.14
14 TYR	HB3	16 SER	HN	4.98
14 TYR	HN	14 TYR	HB2	3.32
14 TYR	HN	14 TYR	HB3	3.35
14 TYR	HN	14 TYR	QD	3.71
14 TYR	HN	15 LYS	HN	3.32
14 TYR	QD	15 LYS	HA	4.64
14 TYR	QD	15 LYS	HN	3.19
14 TYR	QD	16 SER	HN	5.11
14 TYR	QD	17 ALA	HN	5.45
14 TYR	QD	18 VAL	QG1	5.36
14 TYR	QD	18 VAL	QG2	4.80
14 TYR	QE	15 LYS	HN	4.33
15 LYS	HA	15 LYS	QG	4.11

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
15 LYS	HA	18 VAL	HN	4.42
15 LYS	HN	15 LYS	QB	3.12
15 LYS	HN	15 LYS	QD	4.20
15 LYS	HN	15 LYS	QG	3.49
15 LYS	HN	16 SER	HN	3.50
15 LYS	HN	18 VAL	HN	5.08
15 LYS	QB	16 SER	HN	3.75
15 LYS	QB	16 SER	HN	4.50
15 LYS	QD	15 LYS	QE	2.89
15 LYS	QD	15 LYS	QZ	3.69
15 LYS	QD	15 LYS	QZ	4.09
15 LYS	QE	16 SER	HA	3.62
15 LYS	QE	16 SER	HN	3.35
15 LYS	QE	17 ALA	HN	5.50
15 LYS	QG	16 SER	HN	3.40
16 SER	HA	19 GLY	HN	3.92
16 SER	HN	16 SER	HA	2.89
16 SER	HN	16 SER	QB	3.19
16 SER	HN	17 ALA	HN	4.22
16 SER	HN	17 ALA	QB	4.40
16 SER	HN	18 VAL	HB	4.44
16 SER	HN	18 VAL	HN	3.86
16 SER	HN	18 VAL	HN	4.40
16 SER	HN	19 GLY	HN	5.10
16 SER	QB	17 ALA	HN	3.60
16 SER	QB	18 VAL	HN	5.01
17 ALA	HA	18 VAL	HN	3.56
17 ALA	HA	20 PRO	QB	4.52
17 ALA	HA	20 PRO	QD	3.79
17 ALA	HA	20 PRO	QG	3.65
17 ALA	HA	21 ALA	HN	4.20
17 ALA	HA	21 ALA	HN	4.56
17 ALA	HN	17 ALA	QB	2.97
17 ALA	HN	18 VAL	HB	4.58
17 ALA	HN	18 VAL	HN	3.55
17 ALA	HN	18 VAL	QG2	4.81
17 ALA	HN	19 GLY	HN	4.50
17 ALA	HN	19 GLY	HN	4.65
17 ALA	HN	20 PRO	QD	4.30
17 ALA	QB	18 VAL	HN	3.43
17 ALA	QB	18 VAL	QG2	3.86
18 VAL	HA	18 VAL	QG1	3.65
18 VAL	HA	18 VAL	QG2	3.61
18 VAL	HA	19 GLY	HN	4.70
18 VAL	HA	21 ALA	HN	5.50

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
18 VAL	HA	21 ALA	QB	3.74
18 VAL	HB	19 GLY	HN	3.48
18 VAL	HB	19 GLY	QA	4.28
18 VAL	HN	18 VAL	HB	3.24
18 VAL	HN	18 VAL	QG1	3.57
18 VAL	HN	18 VAL	QG2	3.50
18 VAL	HN	19 GLY	HN	4.01
18 VAL	HN	19 GLY	QA	5.41
18 VAL	HN	20 PRO	QD	3.95
18 VAL	HN	21 ALA	HN	4.49
18 VAL	QG1	19 GLY	HN	3.95
18 VAL	QG1	19 GLY	QA	3.59
18 VAL	QG1	21 ALA	HN	4.37
18 VAL	QG1	21 ALA	QB	3.66
18 VAL	QG1	22 ASP	HN	4.32
18 VAL	QG2	19 GLY	HN	4.28
18 VAL	QG2	21 ALA	HN	4.80
18 VAL	QG2	21 ALA	QB	4.18
19 GLY	HN	20 PRO	QB	5.50
19 GLY	HN	20 PRO	QD	3.26
19 GLY	HN	20 PRO	QG	4.46
19 GLY	HN	21 ALA	HN	4.60
19 GLY	HN	21 ALA	QB	4.45
19 GLY	HN	22 ASP	HN	5.50
19 GLY	HN	22 ASP	QB	5.50
19 GLY	QA	21 ALA	QB	4.31
20 PRO	HA	21 ALA	HN	3.50
20 PRO	QB	21 ALA	HN	3.68
20 PRO	QD	21 ALA	HN	3.71
20 PRO	QD	22 ASP	HN	4.31
20 PRO	QD	23 TRP	HD1	4.81
20 PRO	QG	21 ALA	HN	4.24
21 ALA	HA	22 ASP	HN	3.50
21 ALA	HA	23 TRP	HE1	5.27
21 ALA	HA	23 TRP	HN	4.34
21 ALA	HA	23 TRP	HN	4.50
21 ALA	HA	24 VAL	HA	5.50
21 ALA	HA	24 VAL	HB	3.79
21 ALA	HA	24 VAL	HN	3.91
21 ALA	HA	24 VAL	QG1	4.51
21 ALA	HA	24 VAL	QG2	4.51
21 ALA	HA	24 VAL	QQG	3.15
21 ALA	HN	21 ALA	QB	3.01
21 ALA	HN	22 ASP	HN	3.69
21 ALA	HN	22 ASP	QB	4.41

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
21 ALA	QB	22 ASP	HA	5.29
21 ALA	QB	24 VAL	QQG	4.59
22 ASP	HA	24 VAL	QQG	5.44
22 ASP	HA	25 ILE	HB	4.20
22 ASP	HA	25 ILE	HN	3.99
22 ASP	HA	26 SER	HN	4.08
22 ASP	HN	22 ASP	QB	3.61
22 ASP	HN	23 TRP	HA	5.14
22 ASP	HN	23 TRP	HD1	5.50
22 ASP	HN	23 TRP	HN	3.81
22 ASP	HN	24 VAL	HB	5.37
22 ASP	HN	24 VAL	HN	4.34
22 ASP	HN	25 ILE	HB	5.39
22 ASP	HN	25 ILE	QG2	4.29
22 ASP	QB	23 TRP	HN	3.84
23 TRP	HA	23 TRP	HD1	4.87
23 TRP	HA	23 TRP	HE3	4.81
23 TRP	HA	24 VAL	HN	4.00
23 TRP	HA	26 SER	HN	4.10
23 TRP	HA	27 ALA	HN	4.55
23 TRP	HB2	23 TRP	HD1	3.90
23 TRP	HB3	27 ALA	HN	6.00
23 TRP	HD1	24 VAL	HN	5.10
23 TRP	HE3	24 VAL	HA	3.52
23 TRP	HE3	24 VAL	HB	5.50
23 TRP	HE3	24 VAL	HN	4.11
23 TRP	HE3	24 VAL	QG1	5.22
23 TRP	HE3	24 VAL	QG2	4.92
23 TRP	HE3	24 VAL	QQG	4.18
23 TRP	HE3	25 ILE	HN	5.38
23 TRP	HE3	26 SER	HN	5.15
23 TRP	HE3	27 ALA	HN	4.79
23 TRP	HH2	24 VAL	HA	4.89
23 TRP	HH2	24 VAL	HN	5.50
23 TRP	HH2	24 VAL	QQG	5.44
23 TRP	HN	23 TRP	HB2	4.03
23 TRP	HN	23 TRP	HB3	4.03
23 TRP	HN	23 TRP	HD1	4.13
23 TRP	HN	23 TRP	HE1	5.45
23 TRP	HN	23 TRP	HE3	5.01
23 TRP	HN	23 TRP	QB	3.33
23 TRP	HN	24 VAL	HB	4.47
23 TRP	HN	24 VAL	HN	3.51
23 TRP	HN	24 VAL	QG1	4.63
23 TRP	HN	25 ILE	QG2	4.28

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
24 VAL	HA	24 VAL	QG1	4.26
24 VAL	HA	24 VAL	QG2	4.26
24 VAL	HA	25 ILE	HN	4.00
24 VAL	HA	26 SER	HN	4.80
24 VAL	HA	26 SER	HN	4.80
24 VAL	HA	27 ALA	HN	4.00
24 VAL	HB	25 ILE	HA	5.50
24 VAL	HB	25 ILE	HN	3.96
24 VAL	HB	26 SER	HN	5.00
24 VAL	HB	26 SER	HN	5.50
24 VAL	HB	27 ALA	HN	5.50
24 VAL	HB	27 ALA	HN	5.50
24 VAL	HN	24 VAL	HB	3.57
24 VAL	HN	24 VAL	QG1	3.29
24 VAL	HN	24 VAL	QG2	3.57
24 VAL	HN	25 ILE	HA	5.50
24 VAL	HN	25 ILE	HB	5.50
24 VAL	HN	25 ILE	HN	5.31
24 VAL	HN	26 SER	HN	4.26
24 VAL	HN	25 ILE	HN	3.92
24 VAL	QG1	27 ALA	HN	4.65
24 VAL	QG1	25 ILE	QG2	3.32
25 ILE	HA	26 SER	HA	5.50
25 ILE	HA	26 SER	HN	4.00
25 ILE	HA	27 ALA	HN	4.50
25 ILE	HA	27 ALA	HN	4.55
25 ILE	HA	28 VAL	HB	4.04
25 ILE	HA	28 VAL	HN	3.43
25 ILE	HA	28 VAL	QQG	4.08
25 ILE	HA	29 ARG	HE	5.50
25 ILE	HA	29 ARG	HN	4.05
25 ILE	HB	26 SER	HN	3.65
25 ILE	HN	25 ILE	HB	2.79
25 ILE	HN	25 ILE	QG2	3.53
25 ILE	HN	26 SER	HN	3.60
25 ILE	HN	26 SER	QB	5.50
25 ILE	QG2	26 SER	HN	3.16
25 ILE	QG2	27 ALA	HN	4.30
25 ILE	QG2	29 ARG	HE	4.05
26 SER	HA	27 ALA	HN	4.00
26 SER	HA	29 ARG	HE	4.62
26 SER	HA	29 ARG	HN	3.92
26 SER	HA	29 ARG	QD	3.97
26 SER	HA	30 GLY	HN	4.25
26 SER	HN	26 SER	QB	2.71

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
26 SER	HN	27 ALA	HN	5.03
26 SER	HN	28 VAL	HB	5.14
26 SER	HN	29 ARG	QD	4.44
26 SER	QB	27 ALA	HN	3.25
27 ALA	HA	28 VAL	HN	3.70
27 ALA	HN	28 VAL	HA	5.07
27 ALA	HN	28 VAL	HB	4.62
27 ALA	HN	28 VAL	HN	3.37
27 ALA	HN	29 ARG	HN	4.58
28 VAL	HA	28 VAL	QQG	3.13
28 VAL	HA	30 GLY	HN	4.22
28 VAL	HA	30 GLY	HN	4.48
28 VAL	HA	31 PHE	HN	3.79
28 VAL	HA	31 PHE	QB	3.79
28 VAL	HA	31 PHE	QD	4.94
28 VAL	HA	32 ILE	HN	4.36
28 VAL	HA	32 ILE	QG2	6.00
28 VAL	HB	29 ARG	HE	5.19
28 VAL	HB	29 ARG	HN	3.49
28 VAL	HB	30 GLY	HN	4.76
28 VAL	HB	31 PHE	HN	5.50
28 VAL	HN	28 VAL	HB	3.28
28 VAL	HN	28 VAL	QG2	3.01
28 VAL	HN	29 ARG	HN	3.39
28 VAL	HN	30 GLY	HN	4.30
28 VAL	HN	31 PHE	HN	4.98
28 VAL	QG1	29 ARG	HN	3.33
28 VAL	QG1	30 GLY	HN	5.11
28 VAL	QG1	31 PHE	QD	5.50
28 VAL	QG1	32 ILE	HN	4.33
28 VAL	QG2	29 ARG	HN	3.88
28 VAL	QG2	31 PHE	QD	5.50
28 VAL	QQG	29 ARG	QB	5.44
28 VAL	QQG	31 PHE	QB	5.44
28 VAL	QQG	31 PHE	QE	5.44
29 ARG	HA	29 ARG	HE	4.68
29 ARG	HA	29 ARG	HE	5.50
29 ARG	HA	29 ARG	QD	4.63
29 ARG	HA	29 ARG	QG	3.57
29 ARG	HA	30 GLY	HN	5.50
29 ARG	HA	32 ILE	QG1	4.97
29 ARG	HA	32 ILE	QG2	3.81
29 ARG	HA	33 HIS	HD2	4.71
29 ARG	HE	30 GLY	HN	6.00
29 ARG	HN	29 ARG	HE	4.42

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
29 ARG	HN	29 ARG	QB	3.03
29 ARG	HN	29 ARG	QD	3.54
29 ARG	HN	29 ARG	QG	3.72
29 ARG	HN	30 GLY	HN	3.46
29 ARG	HN	31 PHE	HN	4.82
29 ARG	HN	31 PHE	QD	5.50
29 ARG	HN	32 ILE	HN	5.05
29 ARG	QB	29 ARG	HE	2.88
29 ARG	QB	29 ARG	HE	4.60
29 ARG	QB	30 GLY	HN	3.67
29 ARG	QD	29 ARG	HE	2.81
29 ARG	QD	30 GLY	HN	4.18
29 ARG	QG	29 ARG	HE	3.38
29 ARG	QG	30 GLY	HN	4.32
29 ARG	QG	31 PHE	HN	4.50
29 ARG	QG	33 HIS	HD2	5.40
30 GLY	HN	30 GLY	QA	2.59
30 GLY	HN	31 PHE	HA	5.45
30 GLY	HN	31 PHE	HN	3.28
30 GLY	HN	31 PHE	QB	4.23
30 GLY	HN	31 PHE	QD	5.50
30 GLY	HN	32 ILE	QG2	4.75
30 GLY	QA	31 PHE	HN	3.29
30 GLY	QA	32 ILE	HN	4.26
30 GLY	QA	33 HIS	HN	3.80
30 GLY	QA	33 HIS	HN	4.21
31 PHE	HA	31 PHE	QD	3.44
31 PHE	HA	32 ILE	HN	3.70
31 PHE	HA	33 HIS	HN	4.23
31 PHE	HA	34 GLY	HN	4.01
31 PHE	HN	31 PHE	QB	2.94
31 PHE	HN	31 PHE	QD	3.65
31 PHE	HN	32 ILE	HB	4.39
31 PHE	HN	32 ILE	QG2	4.45
31 PHE	QB	32 ILE	HA	4.73
31 PHE	QB	32 ILE	HN	3.28
31 PHE	QD	32 ILE	HN	3.74
31 PHE	QD	32 ILE	HA	5.50
31 PHE	QD	32 ILE	QD1	3.78
31 PHE	QD	33 HIS	HN	5.50
31 PHE	QD	34 GLY	HN	4.97
31 PHE	QE	32 ILE	HA	5.50
32 ILE	HA	32 ILE	QD1	3.54
32 ILE	HA	32 ILE	QG1	4.24
32 ILE	HA	32 ILE	QG2	4.02

<i>Residue 1</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Residue 2</i>	<i>Kjerne</i>	<i>Avstand (Å)</i>
32 ILE	HA	33 HIS	HN	3.61
32 ILE	HA	34 GLY	HN	4.07
32 ILE	HB	32 ILE	QD1	3.65
32 ILE	HB	33 HIS	HB3	5.50
32 ILE	HB	33 HIS	HD2	5.25
32 ILE	HB	33 HIS	HN	3.92
32 ILE	HN	32 ILE	HB	3.29
32 ILE	HN	32 ILE	QG1	3.82
32 ILE	HN	32 ILE	QG2	3.15
32 ILE	HN	33 HIS	HD2	5.49
32 ILE	HN	33 HIS	HN	2.76
32 ILE	QG1	33 HIS	HN	4.55
32 ILE	QG1	34 GLY	HN	5.24
32 ILE	QG2	32 ILE	QG1	3.19
32 ILE	QG2	33 HIS	HD2	4.93
32 ILE	QG2	33 HIS	HN	3.22
32 ILE	QG2	34 GLY	HN	4.49
33 HIS	HA	33 HIS	HD2	5.14
33 HIS	HA	34 GLY	HN	3.41
33 HIS	HB2	34 GLY	HN	4.28
33 HIS	HB2	34 GLY	QA	4.80
33 HIS	HB3	34 GLY	HN	4.28
33 HIS	HN	33 HIS	HB2	3.60
33 HIS	HN	33 HIS	HB3	3.30
33 HIS	HN	33 HIS	HD2	3.94
33 HIS	HN	33 HIS	QB	2.81
33 HIS	HN	34 GLY	HN	2.98
33 HIS	HN	34 GLY	QA	4.60
34 GLY	HN	34 GLY	QA	2.50